

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.Б.12 Микробиология

Направление подготовки: 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Профиль образовательной программы :Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения :очная

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| 1. Конспект лекций..... | 4 |
| 1.1 Лекция № 1 Введение в дисциплину. Предмет, задачи, связь с другими науками. История развития. Техника безопасности при работе в бак. лаборатории..... | 4 |
| 1.2 Лекция № 2 Систематика и морфология микроорганизмов..... | 8 |
| 1.3 Лекция № 3 Особенности морфологии микроскопических грибов..... | 11 |
| 1.4 Лекция № 4 Физиология микроорганизмов..... | 13 |
| 1.5 Лекция № 5 Генетика микроорганизмов. Полимеразная цепная реакция..... | 16 |
| 1.6 Лекция № 6 Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Стерилизация. Методы стерилизации..... | 20 |
| 1.7 Лекция № 7 Биогеохимическая деятельность микроорганизмов..... | 26 |
| 1.8 Лекция № 8 Понятие инфекции. Патогенность и вирулентность. Виды инфекции..... | 31 |
| 1.9 Лекция № 9 Иммунитет и факторы врождённого иммунитета..... | 37 |
| 1.10 Лекция № 10 Инфекционный иммунитет..... | 40 |
| 1.11 Лекция № 11 Основные формы иммунного реагирования..... | 43 |
| 1.12 Лекция № 12 Возбудители стафилококкозов..... | 45 |
| 1.13 Лекция № 13 Возбудитель колибактериоза..... | 47 |
| 1.14 Лекция № 14 Возбудители сальмонеллёзов..... | 50 |
| 1.15 Лекция № 15 Возбудитель листериоза..... | 53 |
| 1.16 Лекция № 16 Возбудитель рожи свиней..... | 55 |
| 1.17 Лекция № 17 Возбудители туберкулёза..... | 58 |
| 1.18 Лекция № 18 Возбудители бруцеллёза..... | 63 |
| 1.19 Лекция № 19 Возбудитель сибирской язвы..... | 66 |
| 1.20 Лекция № 20 Возбудители клостридиозов..... | 70 |
| 1.21 Лекция № 21 Возбудители лептоспироза..... | 75 |
| 2. Методические указания по выполнению лабораторных работ..... | 78 |
| 2.1 Лабораторная работа 1 (ЛР-1) Введение в дисциплину. Предмет, задачи, связь с другими науками. История развития. Техника безопасности при работе в бак. лаборатории..... | 78 |
| 2.2 Лабораторная работа 2 (ЛР-2) Систематика и морфология микроорганизмов..... | 80 |
| 2.3 Лабораторная работа 3 (ЛР-3) Особенности морфологии микроскопических грибов..... | 81 |
| 2.4 Лабораторная работа 4 (ЛР-4) Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Стерилизация. Методы стерилизации..... | 83 |
| 2.5 Лабораторная работа 5 (ЛР-5) Разнообразие питательных сред. Культивирование и методы учёта численности микроорганизмов..... | 85 |
| 2.6 Лабораторная работа 6 (ЛР-6) Выделение чистой культуры микроорганизмов..... | 91 |
| 2.7 Лабораторная работа 7 (ЛР-7) Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистой культуры..... | 94 |
| 2.8 Лабораторная работа 8 (ЛР-8) Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам..... | 97 |
| 2.9 Лабораторная работа 9 (ЛР-9) Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ..... | 97 |
| 2.10 Лабораторная работа 10 (ЛР-10) Экспериментальное заражение лабораторных животных. Определение вирулентности и факторов патогенности микроорганизмов. Правила вскрытия и бактериологического исследования трупов лабораторных животных..... | 100 |
| 2.11 Лабораторная работа 11 (ЛР-11) Отбор, консервирование, транспортировка и хранение материала для микробиологического исследования..... | 102 |
| 2.12 Лабораторная работа 12 (ЛР-12) Принципиальная схема микробиологической | |

| | |
|--|-----|
| диагностики инфекционных болезней..... | 104 |
| 2.13 Лабораторная работа 13 (ЛР-13) Серологические реакции. Оборудование для постановки серологических реакций..... | 105 |
| 2.14 Лабораторная работа 14 (ЛР-14) Реакция агглютинации (РА)..... | 107 |
| 2.15 Лабораторная работа 15 (ЛР-15) Реакции преципитации (РП): кольце-преципитации (РКП), диффузионной преципитации (РДП)..... | 110 |
| 2.16 Лабораторная работа 16 (ЛР-16) Реакция связывания комплемента (РСК)..... | 112 |
| 2.17 Лабораторная работа 17 (ЛР-17) Иммуноферментный анализ (ИФА)..... | 114 |
| 2.18 Лабораторная работа 18 (ЛР-18) Метод флуоресцирующих антител (МФА). Реакция нейтрализации (РН)..... | 116 |
| 2.19 Лабораторная работа 19 (ЛР-19) Возбудители стафилококков..... | 118 |
| 2.20 Лабораторная работа 20 (ЛР-20) Возбудитель колибактериоза..... | 120 |
| 2.21 Лабораторная работа 21 (ЛР-21) Возбудители сальмонеллёзов..... | 123 |
| 2.22 Лабораторная работа 22 (ЛР-22) Возбудитель рожи свиней..... | 124 |
| 2.23 Лабораторная работа 23 (ЛР-23) Возбудители туберкулёза..... | 125 |
| 2.24 Лабораторная работа 24 (ЛР-24) Возбудители бруцеллёза..... | 127 |
| 2.25 Лабораторная работа 25 (ЛР-25) Возбудитель сибирской язвы..... | 129 |
| 2.26 Лабораторная работа 26 (ЛР-26) Возбудители клостридиозов..... | 131 |
| 2.27 Лабораторная работа 27 (ЛР-27) Возбудители микотоксикозов..... | 133 |

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в дисциплину. Предмет, задачи, связь с другими науками. История развития. Техника безопасности при работе в бак. лаборатории».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Предмет и задачи микробиологии.
2. Этапы развития микробиологии.
3. Отрасли микробиологии, связь с другими науками.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Предмет и задачи микробиологии

В биосфере нет такой среды, в которой не встречались бы микроорганизмы. Всюду, где есть хотя бы какие-то источники энергии, углерода и азота, обязательно встречаются микроорганизмы, различающиеся по своим физиологическим потребностям и свойствам. Именно это разнообразие, в основе которого лежит способность использовать любые, даже минимальные возможности для существования, исторически обусловило вседесущность микроорганизмов.

Изучением микроорганизмов занимается микробиология (от греч. «микрос» - малый, «биос» - жизнь, «логос» - учение) – одна из фундаментальных биологических наук. Микробиология — это наука, предметом изучения которой являются микроскопические существа, названные микроорганизмами, их биологические признаки, систематика, экология, взаимоотношения с другими организмами, населяющими нашу планету, - человеком, животными, растениями.

Мир микроорганизмов богат и разнообразен. Микроорганизмы очень широко распространены в почве, воде и воздухе всех климатических зон. В воде бактерии найдены на глубине 2700 м у острова Шпицберген, а у берегов Филиппинских островов — на глубине 10462 м. Бактерии могут развиваться при давлении 600 атм, или 60 Мпа (в морях), и температуре 104⁰С (в горячих источниках). Микроорганизмы (бактерии и дрожжи) обнаружены в небольшом антарктическом озере Дон-Жуан, вода которого содержит высокую концентрацию солей (в 13 раз превышает концентрацию в морской воде) и имеет низкую температуру: не замерзает даже при температуре -24⁰С.

Бактерии, дрожжи, споры грибов обнаруживаются в воздухе. Больше всего микроорганизмов над городами, значительно меньше над вершинами высоких гор, ледниками, морями.

В почве обитают самые разнообразные микроорганизмы: бактерии, грибы, водоросли, простейшие. Например, обрабатываемый слой почвы на площади 1 га содержит 2-5 тонн микроорганизмов. Почвенные микроорганизмы разлагают остатки животных и растений до минеральных веществ, тем самым восполняя запасы питательных веществ, необходимых для жизни растений.

Микроорганизмы живут на поверхности тела, в кишечнике человека и животных, на растениях, на пищевых продуктах вокруг нас.

2. Этапы развития микробиологии

В истории микробиологии различают следующие этапы:

1. Эвристический
2. Морфологический или описательный
3. Физиологический
4. Современный (молекулярно-генетический).

1. Первый период развития микробиологии - эвристический период (IV-III тысячелетие до н.э. XVI в. н.э.) начался в 4-3 тыс. до н.э., так как ещё древние люди применяли микроорганизмы в хлебопечении, виноделии.

Используя логические приёмы, учёные древности стали задумываться о причинах заразных болезней. Так Гиппократ, осмысливая теорию причины заболеваний, выдвинул миазматическую теорию, считая источником болезни — миазмы. Лукреций выдвинул теорию «болезнетворных семян». В древности эпидемии считали ни чем иным, как наказанием Божиим. К концу средних веков возникло представление о том, что болезни, вызывающие эпидемии, связаны с инфекционными агентами. Когда бактерии ещё не были обнаружены с помощью микроскопа, Джироламо Фракастро (15 век), врач и поэт из Вероны, в своём трактате высказал мысль об инфекции как следствии передачи «контагиума» - мельчайших живых телец, вызывающих данную болезнь. Он видел в контагиумах причину не только болезней человека, но и разложения растительных остатков. Для предохранения от болезней им были предложены: изоляция больного, карантин, ношение масок, обработка предметов уксусом.

Однако идеи Фракастро оказались слишком преждевременными для восприятия современниками и могли быть признаны лишь в 19 веке.

2. Размеры микроорганизмов лежат за пределами разрешающей способности человеческого глаза, поэтому до изобретения микроскопа человек не знал о существовании столь мелких живых существ. Открытие микробов смогло осуществиться лишь во второй половине 17 века, когда в связи с развитием торговли назрела потребность в усовершенствовании оптики для мореплавания (подзорные трубы, телескопы и т. п.). Открытие мира микробов связано с именем А. Левенгука (1632—1723), который сконструировал первый микроскоп в 1676 г., дающий увеличение до 300 раз. Исследуя под микроскопом различные предметы (дождевую воду, настои, зубной налет, кровь, экскременты, сперму), А. Левенгук наблюдал мельчайших животных.

Он впервые описал эритроциты человека, лягушек и рыб, простейших, сперматозоиды. Он увидел в прозрачной капле воды множество бактерий, которых он назвал «маленькими зверушками», подробно описал и зарисовал основные формы бактерий. С открытия Левенгука начинается период зарождения микробиологии как науки и ее становления. Однако учёные того времени не подозревали о роли, которую играют микроорганизмы в природе. Накопление знаний о микроорганизмах длилось довольно долго, около 100 лет, так как было крайне трудно их изучать. Этот период принято называть описательным, так как изучение микроорганизмов сводилось лишь к описанию их форм, доступных исследованию при помощи далеко не совершенного микроскопа. Их биологические свойства и значение для человека долго ещё оставались во многом не понятными.

3. Микробиологию развивали большие и малые открытия известных и менее известных естествоиспытателей и микробиологов. Иногда это были драматические открытия, особенно в медицинской микробиологии, когда микробиологи, прививая возбудитель себе лично, погибали. Третий период микробиологии — период ее подлинного рождения как самостоятельной биологической науки и стремительного развития — физиологический — связан прежде всего с именами Л. Пастера, Р. Коха и их учеников.

Л. Пастер впервые показал огромную роль микроорганизмов как возбудителей разнообразных биохимических превращений и заболеваний человека. Многочисленные исследования Л. Пастера открыли новый период в развитии микробиологии, который назвали физиологическим.

Первый период научной деятельности Л. Пастера связан с изучением различных видов брожения. Л. Пастер установил, что каждый вид брожения имеет свои возбудители, живущие без воздуха. Было открыто явление анаэробиоза, что имело большое значение для создания теории брожения. Л. Пастер доказал, что микроорганизмы вызывают болезни вина и пива, гниение и распад мочевины.

Следующий этап в жизни Луи Пастера — изучение болезней вина, пива и шелковичных червей и мер борьбы с ними — начало медицинской микробиологии.

Введенный Пастером в 1877 г. метод получения чистых культур бактерий вне организма или той естественной природной среды, где микробы находятся, открыл новую эпоху в микробиологии и обеспечил ее развитие в ближайшие годы.

Второй период научной деятельности Л. Пастера был посвящен изучению возбудителей заболеваний и знаменуется тем, что в это время им были открыты возбудители таких заболеваний, как сибирская язва и бешенство. Против бешенства он создал вакцину. Пастеру принадлежит честь открытия возбудителя куриной холеры, родильной горячки, септицемии, остеомиелита, одного из возбудителей газовой гангрены.

Невозможно переоценить значение открытий Л. Пастера. Его имя навсегда вписано в историю микробиологии. Он первым доказал, что микроорганизмы энергично воздействуют на окружающую природу, в том числе на человека и на пищевые продукты — основу жизни человека. В 1885 г. в лаборатории Л. Пастера был изготовлен первый автоклав.

Пастер не только создал микробиологию как фундаментальную биологическую науку, но и определил ее основные разделы, которые затем выделились в качестве самостоятельных научных дисциплин со своими целями и задачами: общая микробиология, техническая (промышленная), сельскохозяйственная, ветеринарная, медицинская и т. д.

Огромное влияние на становление и развитие медицинской микробиологии оказал немецкий учёный Р. Кох (1843 - 1910). Именно он подвёл окончательную черту под многолетней дискуссией: являются ли обнаруживаемые бактерии случайными спутниками болезни или причиной её?

Он доказал бактериальную природу сибирской язвы. Р. Кох сфотографировал бациллы сибирской язвы и стал основателем микробиологической фотографии. Им был открыт и изучен возбудитель такого заболевания, как туберкулез — *Mycobacterium tuberculosis*, который в его честь назван палочкой Коха, открыт холерный вибрион.

Много времени Р. Кох уделял разработке микробиологических методов исследования: им сконструирован осветительный аппарат к микроскопу, разработан метод микрофотографирования и окрашивания бактерий анилиновыми красителями. Но самым существенным для дальнейшего развития микробиологии было его предложение о введении в микробиологию твердых питательных сред с использованием желатина, а позднее агар-агара. Этот метод дал возможность получать микроорганизмы в виде чистых культур, что открыло совершенно новые подходы для более углубленного изучения микроорганизмов. В экспериментах Р. Коха были выработаны этапы бактериологического исследования, позднее ставшие известными как постулаты Коха.

Один из сотрудников Р. Коха — Робер Петри — предложил особую стеклянную посуду, которую знают и используют микробиологи всего мира, — чашку Петри. Второй сотрудник — Джон Тиндалль — предложил многократное нагревание сред для их стерилизации, получившее название «тиндализация».

Так, благодаря Л. Пастеру и Р. Коху, возникла и начала развиваться новая наука — микробиология. Такое название ей дал соратник Л. Пастера П.Дюкло.

Родоначальником русской микробиологии можно считать Л.С. Ценковского (1822-1887), который изучал микроскопические простейшие, водоросли, грибы, сделал вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных. Организовал первую Пастеровскую станцию в России и предложил вакцину против сибирской язвы.

И.И. Мечников (1845-1916) — основоположник медицинской микробиологии, изучал взаимоотношения хозяина и микроорганизма-паразита. Создал фагоцитарную теорию иммунитета, за что в 1908 г. получил Нобелевскую премию.

Огромный вклад в развитие микробиологии внес советский микробиолог С.Н. Виноградский, изучавший автотрофные бактерии. Он открыл способность некоторых бактерий получать энергию за счет окисления неорганических соединений. Для выделения в лабораторных условиях группы бактерий с определенными свойствами,

предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность преимущественного развития данной группы микроорганизмов. Исследования этого учёного по физиологии микроорганизмов дали возможность русской микробиологии занять ведущее место в мировой науке о микроорганизмах. Он же является основоположником сельскохозяйственной микробиологии.

Наблюдая антагонизм микробов, некоторые исследователи пытались выделять вещества, продуцируемые микробами-антагонистами в окружающую среду, в частности зеленой плесенью, лечебные свойства которой были известны еще в XIX веке. Но практического выхода эти работы не получили и вскоре были забыты.

Английский ученый Александр Флеминг в 1928 г. наблюдал зоны лизиса стафилококка в чашках, случайно проросших зеленой плесенью. Выделенный штамм плесени губительно действовал и на другие микробы. Однако выделить активное начало зеленой плесени — пенициллин — удалось только в 1940 г. В чистом виде пенициллин был получен группой английских химиков во главе с Г. Флори и Э. Чейном. Организация производства и широкое внедрение пенициллина в медицинскую практику потребовали согласованных усилий ученых разных специальностей.

4. Современный этап развития микробиологии начался во второй половине 20-го века. В 1944 году в опытах по трансформации пневмококков впервые было доказано, что носителем генов является ДНК. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно-генетических и молекулярно-биологических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни.

Бурному формированию микробиологии способствовали следующие моменты:

- важнейшие открытия в области молекулярной биологии, генетики, биоорганической химии;
- появление таких новых наук, как генетическая инженерия, биотехнология, информатика;
- появление новых методов и научного оборудования, позволяющих глубже заглянуть в секреты живого организма.

Молекулярно-генетический период характеризуется рядом принципиально важных научных достижений и открытий. К ним относятся:

- расшифровка молекулярно-генетической структуры многих вирусов и микробов; открытие простейших форм жизни - «инфекционного белка» приона;
- расшифровка химического строения и химический синтез некоторых антигенов. Например, пептидов вируса СПИДа (Р.В.Петров, В. Т. Иванов и др.);
- получение рекомбинантных бактерий и рекомбинантных вирусов. Соединение отдельных генов вирусов и бактерий, приобретение рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов, соединяющих свойства родительских особей или приобретающих новые свойства;
- получение вакцин (вакцина против гепатита В, малярии, антигенов ВИЧ и других антигенов), биологически активных пептидов (интерфероны, интерлейкины, ростовые факторы и др.) с помощью схем биотехнологии и приемов генетической инженерии;

Перечислены только наиболее крупные достижения молекулярно-генетического периода развития микробиологии. За этот период был выявлен ряд новых вирусов (возбудители геморрагических лихорадок Ласса, Мачупо; вирус СПИД) и микробов (возбудитель болезни легионеров); созданы новые вакцины и профилактические препараты (вакцины против кори, полиомиелита, свинки, клещевого энцефалита, вирусного гепатита В, полианатоксины против столбняка, газовой гангрены и ботулизма и др.).

В Российской Федерации существует разветвленная сеть научно-исследовательских институтов и предприятий по производству диагностических, профилактических и лечебных препаратов. В системе РАМН действуют крупные научно-исследовательские

институты: эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, вирусологии им. Д. И. Ивановского, полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, вирусных препаратов и др.

3 Отрасли микробиологии, связь с другими науками

Так, этап за этапом развивалась микробиология. По своей сущности микробиология является биологической фундаментальной наукой. Для изучения бактерий она применяет методы таких наук, как физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии.

Микробиология подразделяется на общую и частную. Общая микробиология — изучает фундаментальные закономерности биологии микроорганизмов.

Предметом исследования частной микробиологии являются некоторые представители микромира.

Со временем из недр фундаментальной микробиологии выделились отраслевые науки:

техническая (промышленная) — изучает различные типы процессов брожения, которые используются для получения спиртов, ацетона, глицерина и т. п., а также разрабатывает и организует производство с помощью микробов-продуцентов антибиотиков, витаминов и других биологически активных соединений. Частью промышленной микробиологии можно считать пищевую микробиологию с производством молочнокислых, алкогольных, заквашенных продуктов и хлеба.

сельскохозяйственная — изучает почвенную микрофлору, её роль в круговороте веществ в природе и влияние на структуру и плодородие почв, а также болезни растений, методы предупреждения и борьбы с ними;

ветеринарная — изучает биологию возбудителей заразных болезней животных и разрабатывает методы специфической диагностики, профилактики и лечения их. Ветеринарная микробиология тесно связана с медицинской, так как имеются болезни, общие для животных и человека и передающиеся от животных к человеку.

Медицинская микробиология занимается изучением биологии болезнетворных микробов и особенностей взаимодействия их с организмом человека. Задачей медицинской микробиологии является не только выяснение этиологии инфекционных заболеваний, но и разработка специфических методов их диагностики, профилактики и лечения. Как известно, здесь достигнуты громадные успехи.

К отраслевым наукам относится космическая микробиология — решает задачи поиска жизни на других планетах, проблемы возможного загрязнения космоса земными микробами (спорами), развития микроорганизмов на космических кораблях и привнесения «космических пришельцев- микробов» на Землю.

1.2 Лекция №2 (6 часа).

Тема: «Систематика и морфология микроорганизмов».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Общие признаки и разнообразие микроорганизмов.
2. Систематика и номенклатура микроорганизмов.
3. Основные морфологические группы микроорганизмов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

- 1 Общие признаки и разнообразие микроорганизмов.

Микроорганизмы — это самая обширная по количеству представителей группа, члены которой повсеместно распространены. Отличительными чертами микроорганизмов являются следующие признаки:

- Древность происхождения.
- Малые размеры (определяемые в мкм и нм).

- Особенности физиологии (высокая адаптация к окружающей среде).
- Максимальная плодовитость (кишечная палочка каждые 10-15 минут дает потомство).

Накопление огромного фактического материала потребовало классифицировать изучаемые в микробиологии объекты для удобства работы с ними.

Изучение разнообразия микроорганизмов составляет предмет систематики. Микроорганизмы систематизированы в определенном порядке по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой.

2 Систематика и номенклатура микроорганизмов.

Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется таксономией (от греч. *Taxis* – расположение, порядок).

Систематика микроорганизмов базируется на следующих признаках: морфологических, физиологических, биохимических, генетических, тинкториальных и т.д.

Основной таксономической категорией в микробиологии, как и в других биологических науках, является **вид** – совокупность особей, характеризующихся рядом общих морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических признаков.

Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, носит название **чистой культуры**.

Штамм - это чистая культура микроорганизмов, выделенная из определенного места обитания (воды, почвы, организма животного и т.д.). Разные штаммы микроорганизмов могут различаться по некоторым признакам, например, чувствительности к АБ, способности синтезировать некоторые вещества и т.д.

Первую бактериологическую классификацию разработал Фердинанд КОН. А К. Линней предложил биноминальную номенклатуру, согласно которой каждый вид имеет название, состоящее из двух латинских слов. Первое слово означает род, а второе определяет конкретный вид этого рода и называется видовым эпитетом. Видовой эпитет может быть присвоен, исходя из клинических признаков, вызываемого заболевания, морфологии колоний, местообитания, географического места выявления. Родовое название пишется с заглавной буквы, а второе – со строчной даже в том случае, если видовой эпитет присвоен в честь учёного.

Основными классификационными понятиями помимо вида и штамма, являются следующие:

- **ВИД** – эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих единый генотип, проявляющийся сходными фенотипическими признаками.

- **ПОПУЛЯЦИЯ** – совокупность особей одного вида, относительно длительно обитающих на определенной территории.

- **КУЛЬТУРА** – совокупность бактерий одного вида (чистая) или нескольких видов (смешанная), выращенная на питательной среде (жидкой или плотной).

- **КОЛОНИЯ** – видимое скопление бактерий одного вида на поверхности или в глубине питательной среды.

- **КЛОН** – культура клеток, выращенная из одного микроорганизма методом клонирования.

Ключ к определению видов дают специальные определители бактерий, предложенные рядом авторов. Наиболее широко используемым в настоящее время является определитель Д. Берджи или Д. Берги (американский микробиолог 1860-1937) в 1923 году выпустил первый международный определитель. Последующие издания определителя под названием “*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*” подготовлены Международным комитетом по систематике бактерий и переиздавались 9 раз. В них приводятся последние на время издания сведения о микроорганизмах, их таксономии,

номенклатуре и принципах идентификации, дана экологическая характеристика (место обитания, ниши) и другие свойства.

Представление о месте микроорганизмов среди других живых существ изменялось с течением времени от отнесения их к животным или растениям до выделения в три отдельных домена (надцарства, империи).

Существует формальная нумерическая таксономия, где все признаки альтернативны и имеют «одинаковый вес». Это позволяет дать количественную оценку степени сходства и различия организмов путём вычисления коэффициентов сходства или соответствия. Для использования нумерической классификации необходимо как можно полнее изучить фенотипические признаки микроорганизма, так как от этого зависит точность помещения его в данную группу.

Однако в настоящее время основным является филогенетический подход к систематике микроорганизмов, который учитывает родственные связи и пути эволюции организмов. На основании исследований профессора Иллинойского университета К. Вёзе сделана попытка перехода к филогенетической классификации микроорганизмов. При этом сравнивают нуклеотидные последовательности 16S рибосомальной РНК, состоящей из 1500 нуклеотидов, из которых 900 – консервативны.

Филогения бактерий. Рибосомы – это места синтеза белка, и они имеются поэтому во всех клетках. По своим функциям они очень консервативны; в особенности это относится к рибосомным РНК (рРНК), так как на последовательность их оснований не может влиять ни вырожденность генетического кода, ни супрессорные мутации. Таким образом, рРНК отвечает требованиям, которые можно предъявить всеобщему филогенетическому маркеру. При определении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК у большого числа бактерий обнаружились как неожиданные различия, так и черты сходства. В результате каталогизации нуклеотидных последовательностей были установлены коэффициенты сходства, что привело к созданию дендрограммы, которую следует признать филогенетическим древом.

Этот анализ, кроме того, привел к выводу, что одна из групп бактерий очень сильно отличается от всех остальных; по-видимому, уже очень давно произошло разделение прокариот на две ветви, одну из которых составляет группа архебактерий, а другую – все остальные группы, которые объединяют под названием эубактерий.

Таким образом, можно думать, что от прокариот (прогенот) произошли, с одной стороны архебактерии, а с другой – эубактерии. Имеются также данные, позволяющие предполагать тесные связи между архебактериями и эукариотами.

В настоящее время все живые существа на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рибосомальной РНК разделены на три домена (надцарства): Bacteria, Archaea и Eukarya.

В домен Eukarya вошли все эукариотические организмы как одноклеточные так и многоклеточные, включая человека.

К домену Archaea относятся микроорганизмы, разделённые на три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota и Korarchaeota.

Домен *Bacteria* включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, содержащие пептидогликан. В зависимости от микроскопически различаемой формы (кокки, палочки, спирillлы), от окраски по Грамму и отношению к молекулярному азоту (аэробы, анаэробы) домен *Bacteria* разделён на 19 групп, цианобактерии выделены в виде 20-ой группы.

3. Основные морфологические группы микроорганизмов.

Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Различают:

Кокки – это бактерии шаровидной формы. В зависимости от взаимного расположения различают:

микрококки – отдельно лежащие кокки;

диплококки – парно расположены кокки;
стрептококки – цепочки кокков;
стафилококки – скопление кокков в виде виноградной грозди;
тетракокки – структуры из четырёх кокков;
сарцины – многослойные структуры из 8...16 кокков.

Палочковидные бактерии.

Клетки цилиндрической формы могут располагаться одиночно;
диплобактерии – парами;
стрептобактерии – цепочками.

Палочковидные бактерии, образующие в неблагоприятных условиях специфическую форму существования – спору, диаметр которой не превышает диаметр клетки, называют *бациллами*. Если диаметр споры в клетке существенно превышает её поперечный диаметр, то такие спорообразующие бактерии называют *клостридиями*.

Извитые (спиралевидные) бактерии. К ним относят вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы – клетки в форме слегка изогнутых палочек;
спириллы – бактерии, образующие до 6 завитков;
спирохеты – бактерии со множеством (свыше 6) мелких завитков и в отличие от спирилл без жгутиков.

Ветвящиеся бактерии. Выраженная способность к ветвлению отмечена у прокариот из группы актиномицет; тенденцию к ветвлению проявляют и другие бактерии.

Бактерии без постоянной формы. Микоплазмы лишены клеточной стенки, поэтому их форма легко изменяется.

Существуют микроорганизмы необычной формы (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), ветвящиеся и образующие мицелий (актинобактерии), имеющие гифы с почками, стебельки. Существуют также бактерии, меняющие свою морфологию в течение жизненного цикла (каринобактерии, мукобактерии, нокардии) и обладающие полиморфизмом – свойство некоторых бактерий в процессе роста на питательных средах образовывать формы, отличающиеся от типичной.

Несмотря на то, что термин «микроорганизм» подразумевает малые размеры, этот признак варьирует в довольно широких пределах.

Размеры клеток большинства прокариот находятся в пределах 0,2-10,0 мкм. Однако среди них есть «карлики» (трепонемы, микоплазмы и нанобактерии размерами примерно 0,05-0,1 мкм) и «гиганты» (ахроматиум и макромонас длиной до 100 мкм).

Размеры известных в настоящее время прокариотических микроорганизмов находятся в пределах от 0,05 до 600 мкм.

1.3 Лекция №3 (2 часа)

Тема: «Особенности морфологии микроскопических грибов».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.
2. Бактерии, лишённые клеточной стенки
3. Цитоплазма и мембранны.
4. Рибосомы.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Все структуры бактериальной клетки подразделяются на обязательные и необязательные. К обязательным относятся: клеточная стенка, цитоплазматическая

мембрана, нуклеоид, мезосомы, рибосомы. Не обязательные: капсула, слизистый чехол, пили, жгутики и эндоспоры.

Клеточная стенка. Большинство прокариот имеет ригидную клеточную стенку, под которой расположена ЦПМ. Состав и строение клеточной стенки – важный систематический признак, по которому все прокариоты подразделяются на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки.

Клеточная стенка выполняет следующие функции:

1. Защищает от осмотического шока и других повреждающих факторов.
2. Определяет форму бактерий.
3. Участвует в обмене веществ.
4. У многих микроорганизмов токсична и содержит поверхностный антиген.
5. Участвует в транспорте экзотоксинов.

Грамположительные бактерии имеют мощную клеточную стенку, состоящую из 5-6 слоев пептидогликана (на долю которого приходится до 90% сухой массы клеточной стенки), включающих полимеры тейхоевых кислот, которые являются производными рибита или глицерина. Они пронизывают пептидогликан насквозь или находятся на его поверхности. Выделено 2 типа кислот: *рибитетхоевые* и *глицеринтейхоевые* (клетки каждого вида содержат только один тип тейхоевой кислоты). Липотейхоевые кислоты закреплены в цитоплазматической мембране, они пронизывают пептидогликан или располагаются между ним и мембраной.

Клеточная стенка у грамотрицательных бактерий тонкая, имеют однослойный пептидогликан, на долю которого приходится до 5-10% сухого веса стенки и не содержит тейхоевой кислоты. Пептидогликан покрыт наружной мембраной с мозаичным строением, в ее состав входит липопротеин, фосфолипиды, липополисахарид (ЛПС) и белки. ЛПС обладает иммуногенными свойствами и называется О-Аг.

На особенностях строения и химического состава Г+и Г- бактерий основан метод окраски по Граму. В результате Г+ микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а Г- в красный.

2. Бактерии, лишённые клеточной стенки.

Из любой бактериальной клетки можно получить формы, полностью или частично лишенные клеточной стенки. Они называются соответственно *протопластами* и *сферопластами* и независимо от исходного морфологического типа бактерии из-за отсутствия клеточной стенки принимают шарообразную или грушевидную форму. Кроме того, существуют L-формы бактерий, которые, в отличие от протопластов и сферопластов, способны к размножению, являясь вполне полноценными микробными клетками данного вида бактерий.

L-формы разных видов бактерий морфологически неразличимы. Независимо от формы исходной клетки (кокки, палочки, вибрионы) они представляют собой сферические образования разных размеров. Имеются L-формы:

стабильные — не реверсирующие в исходный морфотип;

нестабильные — реверсирующие в исходный морфотип при устраниении причины, вызвавшей их образование.

В процессе реверсии восстанавливается способность бактерий синтезировать пептидогликан муреин клеточной стенки. L-формы различных бактерий играют существенную роль в патогенезе многих хронических и рецидивирующих инфекционных заболеваний: бруцеллеза, туберкулеза, сифилиса, хронической гонореи и т. д.

3. Цитоплазма и мембранны.

Цитоплазматическая мембрана. Состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Цитоплазматическая мембрана имеет сложную трехслойную структуру, для нее характерна избирательная проницаемость. На долю ЦМ приходится около 10% сухого веса бактерий.

Белки цитоплазматической мембраны разделяют на *структурные и функциональные* (включают ферменты, участвующие в синтетических реакциях на поверхности мембраны, окислительно-восстановительных процессах, а также некоторые специализированные энзимы (например, пермеказы)).

В ЦМ расположена *система электронного транспорта бактерий*, обеспечивающая энергетические потребности.

ЦПМ выполняет ряд функций:

1. Служит осмотическим барьером.
2. Контролирует поступление питательных веществ в клетку и выход метаболитов.
3. Содержит ферменты, участвующие в переносе веществ.
4. В мембране локализуются ферменты, отвечающие за дыхательную активность.
5. Образует инвагинаты – мезосомы.
6. С ЦПМ связаны жгутики и аппарат регуляции их движения.

Между ЦМ и внутренним слоем пептидогликана находится периплазматическое пространство, которое играет существенную роль во взаимодействии ЦМ и клеточной стенки, в нем содержатся различные ферменты (фосфатазы), олигосахариды и другие вещества.

Мезосомы. Прокариоты характеризуются простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, хотя имеют включения. Среди них следует отметить мезосомы – Это инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек и ламелл. Функции:

1. Энергетический метаболизм.
2. Участие в делении клетки, спорообразовании.
3. Обеспечивают транспортировку экзотоксинов у патогенных бактерий.

Однако некоторые исследователи считают, что мезосома – это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии.

Цитоплазма – это сложная коллоидная система, неподвижна. В ней располагается ядерный аппарат – генофор (нуклеоид), который не отделен от нее мембранами; плазмиды, которые связаны со специфическими рецепторами на ЦПМ; рибосомы. Помимо этих основных структурных элементов, в цитоплазме содержатся различные макромолекулы (аминокислоты, тРНК), мезосомы, различные включения, которые образуются в процессе жизнедеятельности: капельки нейтральных липидов, воска, серы, гранулы (у бактерий рода *Clostridium*), волютина (*Spirillum volutans*, *Corynebacterium diphtheriae*). Гранулы, гликоген, зерна волютина служат для бактерий запасным источником энергии. У некоторых бактерий (*Bacillus thuringiensis*) в цитоплазме находятся кристаллы белковой природы, обладающие ядовитым действием для насекомых.

Функции включений: продукты обмена бактериальной клетки, запас питательных веществ.

3.4. Рибосомы.

Рибосомы – Рибонуклеопротеиновые частицы размером около 20 нм, состоящие из двух субъединиц с коэффициентом седиментации 30S для одной и 50S для другой. Объединение субъединиц происходит перед началом синтеза белка в одну, коэффициент седиментации 70S (единиц Сведберга). В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5 000 до 50 000 рибосом.

Функция: синтез белка.

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Физиология микроорганизмов».

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Нуклеоид. Плазмиды.

2. Необязательные компоненты бактериальной клетки. Капсула и слизь.
3. Жгутики и механизмы движения.
4. Запасные вещества бактериальной клетки.
5. Эндоспоры.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Нуклеоид. Плазмиды.

В бактериальной клетке нет ядерной мембраны, ДНК сконцентрирована в цитоплазме в виде клубка, называемого нуклеоидом или генофором.

Нуклеоид бактерий представлен двойной спиральной кольцевой ковалентно замкнутой суперспирализованной молекулой ДНК, составляющей 2-3% сухой массы клетки, не содержит гистонов.

У бактерий существует дополнительная молекула ДНК в виде внекромосомных элементов – **плазмиды** – это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. Они могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированы в неё. Плазмиды не являются обязательным для клетки элементом, хотя могут давать определённые преимущества. Известно, что плазмиды могут нести гены устойчивости к АБ, тяжёлым металлам, различным лекарственным препаратам и т.д.

2 Необязательные компоненты бактериальной клетки. Капсула и слизь.

Капсулы. На поверхности клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы разной толщины, поверхность колоний с клетками выглядит гладкой, влажной и блестящей. Капсула представляет собой слизистый слой, который сохраняет связь с клеточной стенкой, служит внешним покровом бактерий, толщина ее не более 0,2 мкм, в образовании капсулы принимает участие ЦПМ. По химической природе – капсула чаще всего полисахаридной природы, но бывают гликопротеидной и полипептидной природы.

Основная роль капсул для патогенных видов – предохранение клетки от неблагоприятных условий среды обитания. Капсулы содержат запасные питательные вещества, выполняют адгезивную функцию, способствуя прилипанию к поверхности клетки хозяина. Являются важными факторами патогенности: либо маскируют их от фагоцитоза, либо подавляют фагоцитоз.

3. Жгутики и механизмы движения.

Жгутики. Часто подвижность у прокариот обусловлена наличием жгутиков. У бактерий жгутики правовращающие, у архей – левовращающие.

Жгутик состоит из базального тела, включающего четыре (у Г-) или два (у Г+) кольца, стержень и моторные белки, а также из крючка и филамента. Базальное тело закреплено в ЦПМ двумя кольцами М и С, которые часто рассматриваются как одно целое. MS-кольцо окружено несколькими белками, которые называют моторными и от которых вращающий момент передаётся на филамент. В пептидогликановом слое периплазмы у Г- бактерий находится кольцо Р, а во внешней мембране – кольцо L. Оба эти кольца выполняют роль втулки, дополнительно удерживающей механизм жгутика. Все кольца пронизаны жестким стержнем, который передаёт крутящий момент. Механизм жгутика имеет крючок, переходящий затем в филамент, который заканчивается «шапочкой». Филамент состоит из белка флагеллина.

Пили. Это нитеобразные полимерные органеллы белковой природы, локализованные на поверхности клеток. Термином «пили» обозначают все типы нежгутуниковых образований на поверхности клетки, синоним «фимбрии». Тонкие полые нити белковой природы длиной 0,3-10 мкм, толщиной 10 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток. Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых пилины или фимбринами, которые организованы в спиральные структуры. Пили часто

расположены перитрихиально по поверхности клеток, но иногда могут быть локализованы на одном конце клетки.

Пили подразделяются на 2 типа: пили 1 типа обусловливают прикрепление или адгезию бактерий к определенным клеткам организма хозяина. На одну бактериальную клетку приходится от нескольких сотен до нескольких тысяч таких пилей.

Пили 2 типа (конъюгативные или половые – sex pili) участвуют в конъюгации бактерий, обеспечивающей перенос части генетического материала от донора к реципиенту. Они имеются только у бактерий-доноров в ограниченном количестве (1-4 на клетку).

Функции пилей: адгезия, питание, водно-солевой обмен (пили общего типа), передача генетической информации (конъюгативные или половые пили, F-пили), а некоторые — могут принимать участие в движении.

4. Запасные вещества бактериальной клетки.

Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно запасные вещества, называемые также **тельцами включения** (полисахариды, полифосфаты, сера и т.д.). Все запасные вещества присутствуют в клетке в химически инертной форме. Такое состояние препятствует нарушению осмостаза клеточного содеримого. Некоторые включения просто лежат в цитоплазме, другие окружены тонкой мембраной толщиной 2-4 нм. Мембрана обычно белковой природы, но иногда может содержать и липиды. Многие бактерии откладывают гранулы валютина (полифосфатов), которые являются запасным резервуаром фосфата, важного предшественника в синтезе АТФ и ДНК. Элементарная сера содержится в клетках микроорганизмов, использующих соединения серы в своём метаболизме, в виде гранул, окружённых однослойной белковой мембраной.

Таким образом, основной функцией большинства включений можно считать обеспечение клеток энергией и необходимыми элементами в неблагоприятных условиях.

5. Эндоспоры.

Споры. Грамположительные бактерии образуют устойчивые к внешним воздействиям покоящиеся структуры, называемые эндоспорами. Они формируются внутри вегетативных клеток бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Clostridium* и др. Все эти микроорганизмы образуют толстую клеточную стенку грамположительного типа, что, по-видимому, является необходимым для спорообразования. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к действию таких факторов как нагревание, УФ-облучение, действие химических дезинфицирующих, растворителей, к высушиванию. В природе образование спор помогает клеткам избегать гибели при истощении субстрата или высушивании, воздействии радиации или химических веществ. Обычно спора в клетке закладывается одна, однако известны случаи формирования до пяти спор в одной бактериальной клетке.

Некоторые эндоспоры остаются жизнеспособными в течение 500 лет (напр. споры бацилл сибирской язвы в скотомогильниках), но совершенно уникальным является случай проращивания спор *Bacillus cereus*, обнаруженных в кишечнике пчелы, найденной в кусочке янтаря, насчитывающего 25-30 млн. лет. Из-за высокой резистентности и того факта, что многие спорообразующие бактерии являются опасными патогенами, борьба со спорами играет важную роль в пищевой, медицинской и промышленной микробиологии.

Эндоспоры хорошо просматриваются в клетках с помощью светового или электронного микроскопа. Поскольку споры практически непроницаемы для многих видов красителей, они наблюдаются как неокрашенные тельца на фоне прокрашенного остального содеримого клетки. Но есть специальные методы дифференциальной окраски спор.

Электронно-микроскопические исследования показали, что их структура довольно сложна. Споры большинства клеток гладкие и овощные, хотя встречаются и круглые, а также с характерными поверхностями. Спора окружена тонким экзоспориумом, за ним (по

направлению к центру споры) лежит оболочка споры, состоящая из нескольких белковых слоёв, имеющая, как правило, значительную толщину. Оболочка практически не проницаема для химических веществ, вследствие чего спора обладает существенной устойчивостью к дезинфектантам. За оболочкой располагается кортекс, который может занимать до половины объёма споры. Кортекс состоит из пептидогликана, менее поперечносшитого, чем пептидогликан вегетативной клетки.

Клеточная стенка споры (или стенка ядра споры) расположена внутри кортекса и окружает протопласт (или ядро споры). Ядро споры содержит нормальные клеточные структуры, такие как нуклеоид и рибосомы. Ядро несёт в себе всё необходимое для начала роста, запасённое в стабильной форме. Ядро лишено компонентов вегетативной клетки, которые либо нестойки, либо могут быть легко восполнены при начале прорастания споры.

Споруляция обычно начинается при истощении питательных веществ в среде. Образование споры – сложный процесс, который можно подразделить на 7 стадий. На стадии 1 в материнской клетке формируется второй полноценный нуклеоид, отделяющийся от остального содержимого клетки ЦПМ, которая впячивается внутрь цитоплазмы, образуя септу периспоры (стадия 2). Мембрана продолжает нарастать и окружает незрелую спору двойным слоем (стадия 3). Далее между двумя слоями мембранны начинается формирование кортекса, на этой стадии (4) начинается накопление в споре Са-дипиколината (кальцевая соль дипиколиновой кислоты играет роль в терморезистентности спор). На стадии 5 вокруг кортекса образуются белковые оболочки и экзоспориум. На стадии 6 синтез оболочек завершается, спора превращается в зрелую, увеличивается её светопреломление, термоустойчивость. На стадии 7 происходит лизис спорангия и выход споры. Длительность цикла спорообразования составляет обычно от 7 до 10 часов.

Прорастание спящей споры в активную вегетативную клетку происходит в три стадии: 1. активация; 2) созревание; 3) прорастание. Часто споры не прорастают даже в богатой среде без активации, которая может заключаться в слабом нагреве. Процесс активации заканчивается созреванием, т.е. нарушением состояния покоя споры. Процесс характеризуется набуханием споры, разрывом или поглощением экзоспориума, потерей устойчивости к нагреву и стрессам, утратой способности преломлять свет, увеличением метаболической активности. В период прорастания протопласт споры образует новые компоненты, выходит из остатков споровых оболочек и формирует новую активную клетку бактерий.

1.5 Лекция №5 (4 часа).

Тема: «Генетика микроорганизмов. Полимеразная цепная реакция.».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.
2. Этапы полимеразной цепной реакции.
3. Применение в микробиологии.

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.

XXI век можно без преувеличения назвать веком молекулярной биологии и биотехнологии, поскольку накоплен достаточный объем знаний о строении биологических систем не только на макро-, но и на микроуровне. Эти знания представляют ценность прежде всего в аспекте их практического применения. Знания о НК как универсальном носителе наследственной информации всех клеточных организмов (бактерий, грибов, растений, животных и человека), о ее структуре и функционировании способствовали появлению совершенно новых направлений современной биологической науки, имеющих прикладное значение.

Идея полимеразной цепной реакции осенила изобретателя мгновенно и, как кажется, абсолютно непредсказуемо. Но это только на первый взгляд, поскольку мы помним слова отца микробиологии Л.Пастера, которому принадлежит известная фраза - Удача одаривает только подготовленные умы. Весной поздним вечером вместе с подругой Кэри Мюллис, 39-летний химик-синтетик из калифорнийской биотехнологической фирмы Cetus, ехал в автомобиле в свой загородный дом, когда он догадался о возможности многократного увеличения числа копий участков ДНК в пробирке в процессе реакции, главной особенностью которой являются повторяющиеся температурные циклы, за что, спустя 9 лет, получил Нобелевскую премию по химии. Метод ПЦР назван "изобретением века", поскольку он не только ускорил реализацию программы "Геном человека", но, прежде всего, способствовал повышению эффективности клинической диагностики многих заболеваний человека и животных.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляющееся с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция называется репликация ДНК.

2. Этапы полимеразной цепной реакции.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК).
- 2) Инициация - образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК).
- 3) Элонгация - синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

ПЦР имитирует естественный процесс репликации (размножения) ДНК *in vitro*, в результате чего, в течение нескольких часов из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Помним, что репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках.

Суть метода заключается в том, что маркировав такими блоками специфический только для данного вида организма (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс в пробирке, используют две генетические пробы, называемые праймерами, которые и служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры «прочесывают» раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок.

После присоединения праймеров начинается воспроизведение с помощью фермента полимеразы специфического фрагмента ДНК. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле - это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и в течение 30-40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции.

Полимеразная цепная реакция (Polymerase chain reaction) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфического фрагмента ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Открытие возможности избирательной наработки определённых участков ДНК с помощью ПЦР, произвело, по существу, революционный переворот во взглядах исследователей, и было взято на вооружение представителями различных дисциплин.

Схема ПЦР-диагностики включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение нуклеиновой кислоты).
2. Собственно ПЦР.

3. Детекция продуктов амплификации.

1 этап. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК). Проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК. В процессе выделения нуклеиновой кислоты необходимо предотвратить влияние ингибиторов ПЦР, сконцентрировать нуклеиновую кислоту в объеме, соответствующем формату ПЦР, и предотвратить действие ДНКаз и РНКаз. В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК, выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, именно с помощью метода ПЦР были идентифицированы останки семьи Романовых.

2 этап. Собственно ПЦР или амплификация (amplification — англ. умножение, усиление). Для её проведения необходимы следующие компоненты:

ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

Праймеры — это химически синтезированные олигонуклеотидной природы затравки для ПЦР, определяющие границы (фланкирующие) амплифицируемого участка ДНК-матрицы и комплементарные противоположным её цепям.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ) в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Фермент Таq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК). Таq-полимераза была выделена у микроорганизмов, обитающих в гейзерах - *Thermus aquaticus*.

Магний необходим для функционирования фермента Таq-ДНК-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НС1-буфер, который удерживает pH во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит же-латин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

Минеральное масло насливается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Амплификация состоит из повторяющихся циклов, которые делятся на этапы. Каждый этап протекает при определённом температурном режиме, который разработчики подбирают опытным путём, поэтому значения температур для конкретного этапа могут варьировать в достаточно широком диапазоне.

I этап: Денатурация ДНК (плавление), когда рвутся водородные связи и получается две ниточки. Осуществляется при температуре 930 - 950С в течение 30-40 сек.

II этап: Отжиг праймеров, т.е. их присоединение. Осуществляется при температуре 500 - 650С. Праймеры комплементарны последовательности ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи протекает только между ними.

К подбору праймеров предъявляют определённые требования:

1. Они должны быть комплементарны определённому участку ДНК и не должны быть комплементарны друг другу.

2. Чтобы исключить отрицательный результат, в случае появления мутации, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативных участках их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

3. Праймер должен иметь длину 20—30 нуклеотидов. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР, поскольку короткие праймеры часто «ошибаются».

4. Используемые праймеры должны быть сбалансированы по температуре отжига.

III этап: Достраивание цепей ДНК или элонгация. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Таq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

Три вышеописанных фазы: 1) денатурация ДНК (плавление); 2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг); 3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР.

Далее этот стандартный цикл ПЦР — плавление, отжиг, синтез — воспроизводится многократно, количество ампликонов растет в геометрической прогрессии, поскольку образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей.

Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 108 молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Однако кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20—25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40—45 циклов) в силу

1. истощения дезоксинуклеозидтрифосфатов,
2. истощения праймеров
2. нарастающего температурного повреждения Таq- полимеразы,
3. конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Таq-ДНК-полимеразы.

Детекция продуктов амплификации осуществляется несколькими способами. Это детекция с помощью химических (иммунохимических) реакций, детекция с помощью флюоресценции (при этом могут использоваться различные модификации праймеров), однако до настоящего времени самым простым, доступным и недорогим методом является электрофорез. Для проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси или в агарозный гель добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле. Под действием электрического поля молекулы ДНК движутся от отрицательного полюса к положительному. После просматривания геля в ультрафиолетовом свете можно говорить о результатах ПЦР (в случае успешного прохождения реакции на геле видны светящиеся полоски).

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены гибридизационные схемы детекции. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК можно пометить флуоресцентным красителем, присоединяя его к 5'-концу каждого праймера. В качестве красителей часто используют флуоресцеин и родамин, которые испускают зеленый и красный свет, соответственно.

После ПЦР-амплификации ДНК-мишени проводят разделение флуоресцеин-меченного праймера и продуктов амплификации, затем регистрируют включение метки. Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и

флуоресцирующий продукт. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Таким образом, в процессе реакции происходит многократное избирательное копирование определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом идёт копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

3. Применение в микробиологии.

Амплификация фрагментов ДНК известной специфичности: диагностика инфекционных болезней, определение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности у микроорганизмов.

Амплификация фрагментов ДНК с разным уровнем специфичности: изучение биоразнообразия, составление филогенетических древ.

1.6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Действие физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Стерилизация. Методы стерилизации».

1.6.1 Вопросы лекции:

- 1 Антибиотики.
- 2 Бактериофаги.
- 3 Бактериоцины.

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотики.

В настоящее время антибиотиками считают химические вещества биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые избирательно тормозят рост и размножение или губительно действуют на микроорганизмы и опухоли.

Антибиотики классифицируют по способу получения, по происхождению, по химической структуре, по механизму antimикробного действия.

По способу получения выделяют

- биосинтетические антибиотики (природные). В условиях специальных производств культивируют микроорганизмы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе жизнедеятельности.

- полусинтетические антибиотики. Получают путем биосинтеза с последующей химической модификацией (например присоединение радикалов). В результате улучшаются antimикробные и фармакологические свойства препарата.

- синтетические антибиотики (аналоги природных). Имеют структуру природных, но синтезированы химически.

По происхождению среди природных антибиотиков выделяют растительные (фитонциды), животной природы, микробные (синтезируемые грибами, актиномицетами (80% антибиотиков), бактериями). Первые две группы природных антибиотиков не получили широкого применения в медицине.

Антибиотики оказывают на микробные клетки воздействия, результатом которых может явиться бактерицидный, бактериостатический, бактериолитический, либо антибиотикозависимый эффект.

По химической структуре выделяют:

- β -Лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы);
- Гликопептиды;
- Липопептиды;
- Аминогликозиды;

- Тетрациклины;
- Макролиды;
- Линкозамиды;
- Стрептограмины;
- Хлорамфеникол/левомицетин;
- Рифамицины;
- Полипептиды;
- Полиены.

- β -Лактамы. К данной группе относятся антибиотики, характерной чертой которых является наличие β -лактамного кольца, при разрушении которого препараты теряют свою активность.

Пенициллин Цефалоспорины природный в основе содержит молекулу 6-аминопенициллановой кислоты, которая состоит из двух колец – тиазолидонового и бета-лактамного. Препарат - бензилпенициллин и его соли. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов. Быстро выводится из организма, разрушается под действием желудочного сока, инактивируется пенициллиназами.

Полусинтетические получают при присоединении к бАПК радикалов.

обладают бактерицидным действием, низкой токсичностью, с широким спектром действия (более активны в отношении грамотрицательных микроорганизмов). Получены на основе 7-аминоцефалоспориновой кислоты и содержащие цефемовое (также бета-лактамное) кольцо. По последовательности внедрения различают 4 поколения препаратов, которые отличаются по спектру активности, устойчивости к β -лактамазам, фармакологическим свойствам. Препараты разных поколений не заменяют друг друга, а дополняют.

Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) препараты этой группы в своей молекуле содержат замещенные пептидные соединения. Активны в отношении грамположительных бактерий. Используют при лечении тяжелых инфекций.

Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин) - соединения, в молекуле которых входят аминосахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью (агликоновым фрагментом) молекулы. Обладают бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных аэробных бактерий, стафилококков, некоторых простейших.

Тетрациклины – семейство крупномолекулярных препаратов, имеющих в составе четыре циклических соединения основу молекулы составляет полифункциональное гидроафтаценовое соединение с родовым название тетрациклин. Тип действия – статический. Спектр действия широкий, в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, внутриклеточных паразитов. Полусинтетический препарат – доксициклин.

Новые препараты полусинтетические – глицициклины (тигэциклин). Широкий спектр, более прочная связь с рибосомами.

Макролиды – семейство макроциклических молекул содержат в своей молекуле макроциклическое лактоновое кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. (эритромицин, кларитромицин, азитромицин). Широкий спектр действия, бактериостатический эффект.

По механизму действия среди антибиотиков выделяют:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):

– *Бета-лактамные* антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).

Блокируют образование гетерополимерных цепей на внешней поверхности ЦПМ за счет ингибирования пенициллин-связывающих белков (белков-ферментов – транспептидаз), участвующих в образовании поперечных сшивок. Ингибирование ПСБ приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников ПГ и запуску системы

аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит бактериолизис.

– *Гликопептиды* (ванкомицин, клиндамицин).

Блокируют объединение предшественников пептидогликана в гликопептидные цепи, связывая D-аланин. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (*мегатерапия*);

– Липопептиды формируют каналы в КС при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. В результате происходит деполяризация клеточной мембраны из-за выхода калия, что приводит к гибели бактериальной клетки.

2. *Вызывающие повреждение цитоплазматической мембраны*

Полиеновые антибиотики обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембраны путем взаимодействия (блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не бактерий;

Полипептидные антибиотики лизируют фосфолипидные компоненты ЦПМ. Только местное применение.

3. *Подавляющие белковый синтез*

– нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами – (аминогликозиды), с 50S субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной РНК (на 30S субъединице рибосом – тетрациклины). Эта группа антибиотиков – самая многочисленная, в нее входят

4. *Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот* – эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков относящихся к этой группе – рифампицин, ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции (блокирует синтез мРНК).

Хинолоны оказывают бактерицидный эффект. Ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки – ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушают синтез ДНК.

Все основные осложнения при химиотерапии можно разделить на 2 группы:

- *осложнения терапии со стороны микроорганизма*;
- *осложнения со стороны макроорганизма*:

– *аллергические реакции* Наличие аллергической реакции на один из препаратов той или иной группы, является абсолютным противопоказанием для использования и других препаратов этой группы, так как возможна перекрестная гиперчувствительность;

– *прямое токсическое (органотоксическое) действие химиопрепаратов* – так, противоопухолевые антибиотики обладают гемато-, гепато- и кардиотоксичностью, а все аминогликозиды – ототоксичностью и нефротоксичностью.

– *побочное токсическое (органотропные) эффекты* – эти осложнения связаны не с прямым, а опосредованным действием химиопрепаратов на различные системы макроорганизма. Хлорамфеникол (левомицетин) может подавлять синтез белков не только в микробной клетке, но и в клетках костного мозга, вызывая у части больных развитие стойкой лейкопении

– оценивая влияние антибиотиков на *функциональную активность иммунной системы*, следует помнить, что все антимикробные агенты снижают напряженность иммунитета. Однако, ряд бета-лактамных антибиотиков, например, цефалоспорин 4-го поколения – цефпиром, а также макролиды, фторхинолоны усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а цефтазидим при системном применении и биопарокс – при местном – обладают истинной иммуностимулирующей активностью.

— *реакции обострения* — применение бактерицидных антибиотиков в первые дни заболевания при общем тяжелом состоянии больного нередко приводит к резкому ухудшению его состояния. Вплоть до развития *инфекционно-токсического шока*. В основе этого явления лежит массовая гибель возбудителей, сопровождающаяся освобождением большого количества эндотоксина и других токсических продуктов распада бактериальных клеток. Такие выраженные реакции обострения чаще развиваются у детей, так как процессы детоксикации у них развиты слабее, чем у взрослых;

— *развитие дисбактериоза* — нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры — также одно из частых осложнений химиотерапии. Оно чаще возникает на фоне использования антибиотиков широкого спектра действия. Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений дисбиоза является кандидоз полости рта, гениталий или кишечника.

1. Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов

Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов проявляется развитием *лекарственной устойчивости*.

В настоящее время лекарственная устойчивость *микроорганизмов-возбудителей* различных заболеваний — не только чисто микробиологическая, но и огромная государственная проблема (например, смертность детей от *стафилококкового сепсиса* находится в настоящее время примерно на том же высоком уровне, что и до появления антибиотиков). Это связано с тем, что среди *стафилококков* — возбудителей различных гнойно-воспалительных заболеваний, — довольно часто выделяются штаммы, одновременно устойчивые ко многим препаратам (5—10 и более). Среди *микроорганизмов-возбудителей* острых кишечных инфекций до 80 % выделяемых возбудителей *дизентерии* устойчивы ко многим используемым антибиотикам.

В основе развития лекарственной устойчивости к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам лежат *мутации хромосомных генов* или приобретение *плазмид лекарственной устойчивости*. Прежде всего, необходимо отметить, что существуют роды и семейства микроорганизмов, *природно-устойчивые* к отдельным антибиотикам; в их геноме есть гены, контролирующие этот признак. *Полирезистентны* к антибиотикам и многие представители псевдомонад, неклостридиальных анаэробов и другие микроорганизмы. Такие бактерии являются природными банками (хранилищами) генов лекарственной устойчивости.

Плазмидная устойчивость приобретается микробными клетками в результате *процессов генетического обмена*. Сравнительно высокая частота передачи R-плазмид обеспечивает широкое и достаточно быстрое распространение устойчивых бактерий в популяции. Плазмидная устойчивость может быть множественной, т. е. к нескольким лекарственным препаратам, и при этом достигать достаточно высокого уровня.

Биохимическую основу резистентности обеспечивают разные механизмы:

- *энзиматическая инактивация антибиотиков* — этот процесс осуществляется с помощью синтезируемых бактериями ферментов, разрушающих активную часть антибиотиков.

- *изменение проницаемости клеточной стенки* для антибиотика или подавление его транспорта в бактериальные клетки. Этот механизм лежит в основе устойчивости к тетрациклину;

- *изменение структуры компонентов микробной клетки*, например, изменение структуры бактериальных рибосом сопровождается повышением устойчивости к аминогликозидам и макролидам, а изменение структуры РНК-синтетаз — к рифампицину.

У бактерий одного и того же вида могут реализовываться несколько *механизмов резистентности*.

2. Борьба с лекарственной устойчивостью

Для борьбы с лекарственной устойчивостью, т. е. преодоления резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам, существует несколько путей:

- создание новых химиотерапевтических средств, отличающихся механизмом антимикробного действия (например, созданная в последнее время группа химиопрепаратов – фторхинолоны) и мишенями,
- постоянная *ротация* (замена) используемых в данном лечебном учреждении или на определенной территории химиопрепаратов (антибиотиков),
- комбинированное применение бета-лактамных антибиотиков в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (claveулановая кислота, сульбактам, тазобактам),
- и главное – соблюдение *принципов рациональной химиотерапии*.

Выбор препарата для химиотерапии должен основываться на показателях антибиотикочувствительности соответствующих микроорганизмов – наиболее вероятных возбудителей данной нозологической формы заболевания по данным литературы, или при ориентации на данные о региональной чувствительности тех или иных инфекционных агентов-возбудителей данного заболевания.

2. Бактериофаги.

Бактериофаги (*фаги*) (от др.-греч. φάγω — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки.

Был открыт в 1915 году английским бактериологом Фредериком Туортом, который описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Канадский микробиолог Феликс Д'Эрель в 1917 году выдвинул предположение, что бактериофаги имеют корпскулярную природу, выделив фильтрующийся литический агент из испражнений больных дизентерией. Добавление литического агента к культуре в бульоне и на плотной питательной среде приводило к лизису. Д'Эрель предположил, что это вирус и назвал его бактериофагом – пожирателем бактерий.

Бактериофаги широко распространены в природе, выявлены у большинства бактерий. В настоящее время обнаружены вирусы грибов, поэтому в широком смысле слова бактериофаги часто называют просто фагами.

БФ состоят из ДНК (ДНК или РНК) и белковой оболочки – капсида. Могут иметь нитевидную форму, икосаэдрический капсид (головка фага), сложную форму сперматозоида (головка и хвостовой отросток). Некоторые фаги в хвостовой части содержат лизоцим.

По результату взаимодействия с бактериальной клеткой выделяют вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200-300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий.

Вирулентные бактериофаги имеют следующий жизненный цикл:

1. Фаг приближается к бактерии, и хвостовые нити связываются с рецепторными участками на поверхности бактериальной клетки.

2. Хвостовые нити изгибаются и «заякоривают» шипы и базальную пластинку на поверхности клетки; хвостовой чехол сокращается, заставляя полый стержень входить в клетку; этому способствует фермент лизоцим, который находится в базальной пластинке; таким образом, нуклеиновая кислота фага вводится внутрь клетки.

3. Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии.

4. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка.

5. Нуклеиновая кислота фага реплицируется, и направляет синтез новых белков оболочки.

6. Образуются новые частицы фага в результате спонтанной самосборки белковой оболочки вокруг фаговой нуклеиновой кислоты; под контролем РНК фага синтезируется лизоцим.

7. Лизис клетки: клетка лопается под воздействием лизоцима; высвобождается около 200–1000 новых фагов; фаги инфицируют другие бактерии.

Стадии 1–7 по времени занимают около 30 минут; этот период называется латентным периодом.

Умеренные бактериофаги могут взаимодействовать с бактерией по интегративному типу. В данном случае ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии называется профагом, а культура бактерий, содержащих профаг – лизогенной. Само же явление существования бактерии и умеренного бактериофага носит название лизогении. Профаг, ставший частью хромосомы передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков. Спонтанно или направленно профаги могут переходить в вегетативное состояние и лизировать клетку хозяина. Феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется индукцией профага. Геном профага может придавать бактерии новые свойства (фаговая конверсия).

Бактериофаги используют в лабораторной диагностике при внутривидовой идентификации бактерий, при обнаружении микроорганизма в исследуемом материале, для лечения и профилактики ряда заболеваний, чаще всего кишечных. У таких лекарственных препаратов отсутствует побочный эффект, но и терапевтический эффект умеренный. В генетической инженерии бактериофаги используются в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

3. Бактериоцины.

Бактериоцины – антибактериальные вещества белковой природы, вырабатываемые бактериями и подавляющие жизнедеятельность других штаммов того же вида или родственных видов. Бактериоцины обозначаются в соответствии с видовым или родовым латинским названием продуцента. Спектр активности бактериоцинов в отличие от антибиотиков узок и определяется наличием у бактерий специальных рецепторов для адсорбции.

Молочнокислые бактерии образуют широкий спектр бактериоцинов: курвацин, диацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин, плантарицин и др. (табл. 1). Бактериоцины из молочнокислых бактерий разделяют на две группы. Представители первой группы характеризуются узким спектром антибактериального действия – вызывают гибель организмов, близких к организму-продуценту. В эту группу входят лактоцин В и F-27, амиловорин, педиоцин N5P, термофилин А, курвацин А, амиловорин L471, энтерококцин.

Бактериоцины, относящиеся ко второй группе, ингибируют рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus faecalis*. Перечисленные бактерии вызывают порчу пищевых продуктов, среди них есть и патогенные виды. Показано, что большая часть этих бактериоцинов не токсична и не иммуногенна.

Перспективно применение ряда бактериоцинов, продуцируемых группой молочнокислых бактерий, в пищевой промышленности. Продуценты этих бактериоцинов используются в качестве заквасочной культуры при различных пищевых производствах. Образующийся бактериоцин обеспечивает доминирование нужной микрофлоры и подавление посторонней микрофлоры, что обеспечивает безопасное протекание микробиологических процессов.

Например, при производстве сухой колбасы в качестве заквасочной культуры используется *Lactobacillus curvatus*, образующий курвацин, который ингибирует рост близкородственных лактобацилл и условно-патогенных бактерий и обеспечивает этим безопасное протекание биохимических процессов при созревании сухой колбасы.

Бактериоцины осуществляют естественное предохранение пищевых продуктов, в том числе полученных путем ферментации.

Продуцирующие бактериоцины штаммы микроорганизмов, в частности молочнокислые бактерии, или сами бактериоцины могут быть использованы как природные консерванты пищевых продуктов. Задача состоит в том, чтобы оптимизировать продуцирование бактериоцинов бактериями, повысить активность и стабильность этих соединений, направленно получать бактериоцины с заданными свойствами. Однако появление и селекция вариантов бактерий, устойчивых к бактериоцинам, осложняет использование этих веществ в качестве пищевых консервантов.

Большое количество разнообразных по свойствам бактериоцинов образуется представителями семейства энтеробактерий. Это многочисленная группа грамотрицательных бактерий, факультативных анаэробов, использующих для своего развития разнообразные органические соединения.

Среди бактериоцинов, образуемых энтеробактериями, наиболее полно изучены колицины из *E.coli*, клоацины из *Enterobacter cloacae*; наряду с колицинами выделены альвецины из *Hafnia alvei*, аэроцины из *Aerobacter aerogenes*, марцесцины из *Serratia marcescens*.

Однако применение в настоящее время в медицине колицинов и других бактериоцинов из грамотрицательных бактерий невозможно из-за ряда их отрицательных свойств - быстрой инактивации протеазами, иммуногенности, обусловленной белковым компонентом.

Предполагают, что механизм биологического действия ряда бактериоцинов связан с нарушением проницаемости цитоплазматических мембран.

В настоящее время с применением методов генной инженерии проводятся исследования, направленные на получение штаммов-продуцентов бактериоцинов с заданными свойствами.

В естественных условиях бактериогенеза может быть одним из факторов, влияющих на формирование микробного ценоза. Поэтому большой интерес представляется выяснение значения этого явления для развития популяции. У бактериогенных популяций суммарная защитная активность проявляется в подавлении развития других бактерий, обладающих сходными пищевыми потребностями (родственные виды микроорганизмов). Это подавление обеспечивается бактериоцином, который продуцируют отдельные клетки этой популяции. Эти клетки погибают, но остальные клетки популяции не чувствительны к бактериоцину, который вытесняет другие микроорганизмы, чувствительные к данному веществу. Таким образом, бактериогенные бактерии обладают важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно складывающихся в процессе эволюции.

Штаммы – продуценты бактериоцинов, а также сами бактериоцины широко применяются в качестве компонента пробиотических и синбиотических препаратов, в пищевой промышленности могут использоваться в качестве заквасочных культур, подавляя рост патогенных микроорганизмов и обеспечивая созревание молочнокислых и мясных продуктов, а в последующем – их хранение.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Биогеохимическая деятельность микроорганизмов».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Круговорот химических элементов.
2. Круговорот азота.
3. Круговорот углерода.
4. Круговорот серы.

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Круговорот химических элементов.

Микроорганизмам принадлежит исключительно важная роль в круговороте в природе, в образовании и разрушении месторождений полезных ископаемых, минералов и горных пород, а также в миграции отдельных элементов.

Основы понимания биохимической роли микроорганизмов были заложены на рубеже 19 и 20 вв. исследованиями выдающихся русских микробиологов С. Н. Виноградского, Т. А. Надсона, В. Л. Омелянского, а также В. И. Вернадского.

Будучи широко распространеными в природе и обладая активным ферментативным аппаратом, микроорганизмы осуществляют процессы расщепления и синтеза самых сложных органических веществ. Благодаря минерализующей деятельности микроорганизмов происходит постепенное очищение поверхности земли от трупов животных и остатков растений. По словам В. Л. Омелянского, микроорганизмы являются настоящими могильщиками органического мира. Органические вещества астений и животных под действием микроорганизмов разлагаются на простые минеральные элементы, которые растворяются в воде и используются растениями в качестве источника питания, вовлекаясь таким образом в малый биологический круговорот. Следовательно, биологический круговорот объединяет процессы синтеза и распада органических веществ и обусловлен деятельностью живых организмов.

Помимо биологического круговорота элементов, в природе функционирует большой геологический круговорот. Он осуществляется действием физико-химических факторов и включает процессы выветривания горных пород, растворение минеральных продуктов выветривания и вынос их моря и океаны. Преобладающая часть вынесенных минеральных элементов используется водными организмами и после их смерти частично переходит в состав осадочных пород, выключаясь тем самым из биологического круговорота. Если бы этот процесс был бы постоянно, то жизнь на земной поверхности не могла бы развиваться. Однако этого не происходит, так как биологически важные элементы непрерывно закрепляются в почве благодаря деятельности зеленных растений и некоторых автотрофных микроорганизмов, использующих минеральные элементы для синтеза органического вещества. После отмирания растения и животные минерализуются микроорганизмами и в зависимости от условий поступают в биологический или геологический круговорот. Круговорот веществ совершается по длинной цепи последовательных и тесно связанных между собой реакций

2. Круговорот азота.

В цикл превращений азота входят реакции синтеза сложных азотистых соединений и реакций минерализации органического азота до солей азотной и азотистой кислоты или молекулярного азота.

Цикл азота состоит из четырёх этапов. 1-ый: фиксация молекулярного азота; аммонификация, нитрификация и денитрификация. Фиксация молекулярного азота осуществляется некоторыми аэробными и анаэробными микроорганизмами, фотосинтезирующими бактериями, цианобактериями. К какой бы группе не относился азотфиксатор, конечными продуктами всегда являются азотсодержащие органические вещества.

Аммонификация

Почти весь азот, попадающий в почву в процессе азотфиксации, а также азот растительных и животных тканей, зеленых удобрений, навоза, гумуса содержится в органических белковых соединениях – до 99 % от всего запаса азота в почве. Однако этот азот не может усваиваться растениями. Им необходим минеральный азот. Благодаря деятельности микроорганизмов в почве и воде постоянно происходит разложение органических азотсодержащих веществ до аммиака – это аммонификация – 2-ой этап

цикла азота. Аммонификации подвергаются белковые соединения, алкалоиды, мочевина, нуклеиновые кислоты и т.д. Часть освобождающегося аммиака адсорбируется в обменных реакциях почвы, часть используется гетеротрофными бактериями и превращается в белки их тел; некоторое количество аммиака окисляется автотрофами до нитратов и нитритов или же он может остаться в свободном состоянии и выделяться в атмосферу.

В аммонификации принимают участия многие микроорганизмы, включая не спорообразующие бактерии, бациллы, актиномицеты, микроскопические грибы.

Активными возбудителями процесса являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

Химизм аммонификации состоит в следующем. Расщепление молекулы белка начинается с процесса гидролиза, осуществляемого внеклеточными гидролитическими ферментами, выделяемыми аммонификаторами. В результате образуется более простые продукты: белок – пептоны – пептиды – аминокислоты. Аминокислоты ассимилируются бактериями как источники питания, и под действием внутриклеточных ферментов дезамина – отщепляется аммиак – конечный продукт аммонификации.

Нитрификация

Аммиак и аммонийные соли, образующиеся в процессах аммонификации, подвергаются в почве и водоемах окислению в соли азотистой (нитриты), и затем азотной кислоты (нитраты). Процесс окисления аммиака и аммиачных солей до азотной кислоты называется нитрификацией. Сущность процесса нитрификации была выяснена в классических исследованиях С. Н. Виноградского.

В 1891 г. Он выделил возбудителей нитрификации в чистую культуру и показал, что процесс нитрификации является двухфазным и осуществляется различными видами бактерий.

В первую фазу через ряд промежуточных звеньев происходит окисление аммиака до нитритов. Освобождена при этом энергия обусловливает развитие нитрифицирующих бактерий. Возбудителями первой фазы нитрификации являются бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus*.

Наиболее значимым в процессе нитрификации является род *Nitrosomonas*. Бактерии этого рода имеют палочковидную форму размером 1,5 * 1 мкм. Они грамотрицательны, подвижны, спор не образуют.

Для второй фазы характерно окисление нитритов до нитратов.

Возбудителями второй фазы нитрификации являются бактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*. Представители рода *Nitrobacter* – мелкие (1 * 0,8 мкм) овальные грамотрицательные палочки.

Как и возбудители первой фазы, это типичные хемоавтолитотрофы, т. е. они развиваются на чисто минеральных средах, используя для синтеза органических веществ энергию реакций окисления нитратов, а углерод из углекислого газа.

Нитрификаторы являются облигатными аэробами. Оптимальная температура их развития равна 28-30 0 С. Нитрифицирующие бактерии очень специфичны в отношении окисляемого субстрата. *Nitrosomonas* окисляет только аммиак, а *Nitrobacter* – только соли азотистой кислоты.

Кроме типичных нитрификаторов многие гетеротрофные бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* способны окислять аммиак и другие восстановительные соединения азота до нитритов и нитратов. Этот тип нитрификации получил название гетеротрофной. Она не является источником энергии для бактерий.

Денитрификация

Нитраты частично используются высшими растениями, частично вымываются водой, некоторое же количество их расходуется на построение самих бактерий. Ряд бактерий используют кислород нитратов для окисления органических веществ. При этом происходит восстановление нитратов в нитриты, молекулярный азот и другие газообраз-

ные продукты. Процесс восстановления нитратов получил название денитрификации или нитратредукции.

Денитрифицирующие бактерии относятся к аэробам или факультативным анаэробам. Наиболее активные денитрификаторы известны среди бактерий родов *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*.

3. Круговорот углерода.

Углерод, так же как и азот, является важнейшим элементом органической жизни. Первосточником углерода любого органического вещества служит углекислота воздуха. Содержание ее в воздухе составляет 0,03 % от общего объема газов и является довольно постоянной величиной.

Круговорот углерода начинается с фиксации углекислоты зелеными растениями и автотрофными микроорганизмами. Образовавшиеся в процессе фото- и хемосинтеза организмов углеводы или другие углеродсодержащие органические соединения частично используются этими же организмами для получения энергии, при этом углекислота (продукт реакций окисления) выделяется в среду. Часть фиксированного растениями углерода потребляется человеком и животными, которые выделяют его в форме углекислоты в процессе дыхания. Углерод, выделяющийся в результате разложения отмерших растений и животных, окисляется до углекислоты и тоже возвращается в атмосферу.

Ведущая роль возвращении углерода в атмосферу принадлежит микроорганизмам. В процессах дыхания и брожения они разлагают самые разнообразные органические соединения. Более доступными являются углеродсодержащие соединения, растворимые в воде (углеводы, спирты). Но в естественных условиях - в почве и воде - в гораздо большем количестве встречаются труднорастворимые соединения углерода, такие, например, как крахмал, пектиновые вещества, клетчатка, лигнин. В них сосредоточена основная масса углерода. Разложение их начинается с гидролиза, в результате чего образуются более простые соединения типа углеводов. Дальнейшее превращение данных соединений осуществляется в реакциях дыхания или брожения.

Расщепление крахмала микробами начинается с его гидролиза. Под действием амилазы крахмал превращается в декстрин, затем в мальтозу и изомальтозу. Осахарившийся крахмал легко подвергается действию микробов и в анаэробных условиях разлагается по одному из типов брожения углеводов. В аэробных условиях крахмал окисляется через ЦТК или пентозофосфатный цикл до углекислоты.

Амилолитической активностью обладают многие микроорганизмы. В анаэробных условиях расщепление крахмала осуществляется спорообразующими микроорганизмами рода *Clostridium*. Специализированные виды его (*Cl. amyloliticum*) расщепляют крахмал до стадии кислот, спиртов и газов. Пектиновые вещества растений имеют слизистую консистенцию и сложное химическое строение, поэтому для минерализации растительных тканей необходимо разрушение пектиновых веществ. В почве это разрушение осуществляется в аэробных условиях *B. subtilis*, *Bac. mesentericus*, в анаэробных - *Cl. felsineum* и *Cl. pectinovorum*. Разложение пектина начинается с его гидролиза под действием фермента пектиназы. В результате образуются галактуроновая и уксусная кислоты, метиловый спирт которые далее окисляются до углекислоты и воды. В анаэробных условиях сбраживанию подвергаются только галактоза и арабиноза с образованием масляной кислоты, остальные вещества накапливаются в субстрате или разлагаются аэробами.

Огромное значение в круговороте углерода имеет расщепление целлюлозы (клетчатки). В состав целлюлозы входит более 50 % всего органического углерода биосфера.

Целлюлоза представляет собой очень стойкое органическое соединение и может быть разрушена только при действии сильных химических окислителей. Но в природе она довольно интенсивно разрушается широко распространенными микроорганизмами,

Различают аэробное и анаэробное расщепление целлюлозы. В аэробных условиях большая часть целлюлозы окисляется до углекислоты и воды и лишь незначительное количество ее окисляется не полностью и входит в состав гумуса. В аэробных условиях ведущая роль в разложении целлюлозы принадлежит грибам.

Высокой целлюлолитической активностью характеризуются грибы родов *Fusarium*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*. Возбудителями аэробного окисления целлюлозы являются и бактерии родов *Cytophaga* и *Sporocytophaga* (пор. *Cytophagales*), миксобактерин родов *Myxococcus*, *Archangium* и *Polyangium*, а также сходные с псевдомонадами бактерии группы *Cellvibrio*. Все они широко распространены в природе.

Превращение углеводородов

Углеводороды биогенного и abiогенного (геохимического) происхождения концентрируют значительную часть углерода. Поэтому разложение их составляет важный этап в круговороте углерода. Большинство природных углеводородов частично или полностью окисляется микроорганизмами. Даже такие химически устойчивые соединения, как нефть, каучук, парафин разлагаются под действием микроорганизмов.

Способностью к расщеплению ароматических углеводородов обладают многие бактерии и грибы: псевдомонады, микробактерии, бациллы и дрожжи. При соответствующих условиях они производят полное окисление определенного углеводорода без накопления промежуточных продуктов. Например, некоторые штаммы нокардий, в частности, *Nocardia corallina*, могут расти на бензоле или толуоле как единственных источниках углерода без накопления промежуточных продуктов. Нафталин и антрацен также могут использоваться отдельными штаммами *Nocardia* и *Corynebacterium*.

4. Круговорот серы.

Микроорганизмы осуществляют 3 этапа превращения серы: минерализацию органической серы, окисление минеральной серы и восстановление минеральной серы. Эти три этапа определяют три основные формы природной серы: органическую серу в белках, АМК; сульфаты и сульфиты; сероводород и сульфиды.

Минерализация органической серы. В этом процессе участвую многочисленные неспециализированные гетеротрофные микроорганизмы.

В расщеплении органических соединений серы участвуют и многообразные аэробные и анаэробные бактерии грибы и некоторые актиномицеты. В анаэробных условиях *Proteus vulgaris*, *Bac. subtilis* образуют H_2S из цистина и цистеина. Грибы *Microsporum* и *Asp. niger* образуют метилмеркаптаны и сульфаты; актиномицеты при разрушении метионина образуют окислительные

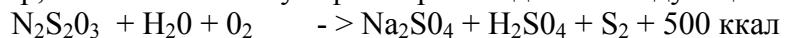
соединения серы и сульфиды. Окисление минеральной серы.

Окисление минеральной серы, получившее название сульфофикации, включает процессы окисления сероводорода, элементарной серы, тио- и тетрасоединений. Эти процессы вызываются особыми группами бактерий - серобактериями и тионовыми бактериями, широко распространенными как в почвах, так и в водоемах.

Окисление сероводорода серобактериями осуществляется в два этапа. Сначала происходит внутриклеточное окисление сероводорода до элементарной серы. Последняя накапливается в форме гранул капельножидкой серы в протоплазме клеток, что и определило название данных бактерий. Откладываемая в протоплазме клеток сера является запасным питательным материалом. Если сера обедняется сероводородом, то эта сера начинает быстро окисляться до серной кислоты.

Образующаяся серная кислота вступает в реакцию с бикарбонатами кальция и превращается в гипс ($CaSO_4$), который диффундирует из клеток в окружающую среду. Поэтому для развития серобактерий необходимо наличие в среде бикарбонатов.

Тионовые бактерии. В отличие от серобактерий, тионовые бактерии способны окислять сернистые соединения без отложения серы внутри клетки. Сера накапливается вне клетки. Например, окисление гипосульфита происходит по следующей схеме:



За счет освобождающейся энергии бактерии ассимилируют углекислый газ. Ассимиляция углекислоты совершается по циклу Кальвина, подобно тому как у зеленых растений при фотосинтезе.

Тионовые бактерии в природных условиях производят окисление сульфидных минералов, способствуя тем самым выщелачиванию находящихся в руде металлов. При участии тионовых бактерии окисление сульфидов и выщелачивание металлов идет быстрее, чем при их отсутствии и, кроме того, сопровождается большим выходом металлов. Тионовые бактерии, в частности *Th. thiooxidans*, используются в гидрометаллургии для выщелачивания редких металлов: германия, галия, селена, индия, которые содержатся в сульфидах цинка, свинца, меди.

Восстановление минеральной серы

Процесс восстановления соединений минеральной серы до сероводорода получил название десульфофиксации. Он происходит в анаэробных условиях: в водоемах на значительных глубинах, в почвах, насыщенных водой, торфяниках (об этом говорит и их черная окраска, обусловленная наличием сульфидов железа).

Восстановление сульфатов осуществляется группой специальных факультативных автотрофных десульфофицирующих бактерий. Одна из этих бактерий была выделена М. Бейеринком в 1895 г. из сточной воды и названа *Vibrio desulfuricans*. Это анаэробная грамотрицательная бактерия, имеющая форму вибриона.

Сульфатредуцирующие бактерии являются облигатными анаэробами. В качестве конечного акцептора водорода они используют сульфаты. Донором водорода могут служить различные органические соединения (спирты, кислоты) и молекулярный водород. В качестве побочного продукта сульфатного дыхания образуется сероводород. Восстановление сульфатов происходит по уравнению.

Органические соединения сульфатредуцирующие бактерии окисляют не до конца, чаше до уксусной кислоты.

Сульфатредуцирующие бактерии представлены бактериями двух родов: *Desulfovibrio* и *Desulfatotomaculum*. Первые имеют форму вибриона с полярно расположенным жгутиком. Спор не образуют, второй род включает 4 вида бактерий - термофилы и мезофиллы. Энергию получают в результате окислительного фосфорилирования, это обеспечивает возможность ассимиляции органических веществ.

1.8. Лекция № 8 (2 часа)

Тема: «Понятие инфекции. Патогенность и вирулентность. Виды инфекции»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Понятие инфекции, инфекционного процесса, болезни.
2. Свойства возбудителя, способствующие возникновению инфекционной болезни.

Патогенность и вирулентность.

3. Виды инфекции.

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие инфекции, инфекционного процесса, болезни.

Среди многочисленных заболеваний, которым подвержены человек и животные, инфекционные болезни занимают особое место, так как появление их обязано встрече с болезнетворными микробами. На современном этапе развития науки под инфекцией понимают взаимодействие патогенного микроорганизма и восприимчивого хозяина в определенных условиях внешней среды.

Состояние инфекции, как всякого биологического процесса, динамично. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют инфекционным процессом.

Инфекционный процесс, с одной стороны, включает внедрение, размножение и распространение патогенного микробы в организме, а с другой — реакцию организма на это действие. Эти реакции выражаются в биохимических, морфологических, функциональных и иммунологических изменениях, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма.

Крайней степенью проявления инфекционного процесса является инфекционная болезнь, которая обусловлена патологическими процессами, вызванными действием возбудителя и характеризуется определенной клинической картиной.

Инфекционная болезнь имеет ряд особенностей, отличающих ее от болезней неинфекционного характера

1. Инфекционная болезнь вызывается определенным специфическим возбудителем.

2. Заболевший организм сам становится источником возбудителя инфекции, который выделяется из больного организма и заражает здоровых животных, т.е. инфекционной болезни присуща заразность, микробоносительство.

3. В больном организме происходят процессы образования специфических антител, в результате этого организм после выздоровления становится в большинстве случаев иммунным, т.е. невосприимчивым к повторному заражению тем же возбудителем.

Для возникновения инфекционной болезни требуется несколько условий:

1. микроб должен быть достаточно вирулентным;

2. необходимо внедрение определенного количества микробов;

3. они должны проникнуть в организм через наиболее благоприятные для них ворота инфекции и достичь восприимчивых тканей. Место проникновения патогенных микробов в организм называется входными воротами инфекции;

4. организм хозяина, должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни;

5. необходимы определенные условия среды, при которых происходит взаимодействие между микробы и организмом.

Инфекционный процесс характеризуется циклическим развитием и включает в себя следующие периоды: инкубационный, продромальный, клинический (разгар болезни), исход болезни

Инкубационный период — определенный промежуток времени от момента проникновения микробы до появления первых признаков болезни. В этот период возбудитель адгезируется на чувствительные клетки организма в месте входных ворот (например, верхние дыхательные пути, слизистая ЖКТ и т.д.). При разных инфекционных болезнях он неодинаков: от нескольких дней, месяцев до нескольких лет.

Продромальный период (период предвестников болезни) характеризуется первыми, не всегда специфическими для данной болезни, симптомами: повышением температуры тела, слабостью, угнетением, потерей аппетита. В этот период возбудитель колонизирует чувствительные клетки, происходит расселение микроорганизмов в биотопе хозяина. Продолжительность периода — от нескольких часов до 4 суток.

Период развития основных клинических признаков (период разгара болезни), когда проявляются основные характерные для данной инфекционной болезни признаки (при язве — афты, при бешенстве — параличи, при ботулизме — расслабление мышц), угнетение, высокая температура, нарушение дыхания, пищеварения и др. В этот период возбудитель интенсивно размножается в организме хозяина. В этот период больной заразен, так как возбудитель выделяется во внешнюю среду.

Исход болезни. После прекращения размножения возбудителя и по мере его выведения наступает период реконвалесценции (выздоровления), когда постепенно восстанавливаются физиологические функции организма. Клиническое выздоровление при многих инфекционных болезнях не совпадает по времени с освобождением организма

от возбудителя. В некоторых случаях возможно формирование бактерионосительства с длительным пребыванием возбудителя в организме хозяина, перенесшего инфекцию (сальмонеллез, пастереллез, туберкулез и др.). Эти животные представляют опасность как источник возбудителя инфекции. При неблагоприятном исходе животное может погибнуть.

2. Свойства возбудителя, способствующие возникновению инфекционной болезни. Патогенность и вирулентность.

Возбудитель как участник инфекционного процесса характеризуется двумя основными качествами: патогенностью и вирулентностью. Потенциальную способность микроорганизма паразитировать в организме животных и вызывать инфекцию (инфекционный процесс) называют патогенностью, болезнетворностью.

Патогенность – качественная характеристика вида, определяемая его генотипом, это потенциальная способность возбудителя вызывать инфекционный процесс. Факторы патогенности связаны со структурными элементами микробной клетки, ее метаболизмом. Они позволяют патогенному микроорганизму не только проникнуть и сохраниться, но и размножаться, распространяться в тканях и органах животного, активно воздействовать на его функции.

Каждый вид болезнетворных микробов характеризуется специфическим набором факторов патогенности. Этот набор определяет характер патогенного действия, т.е. способность вызывать определенный инфекционный процесс. Например, ящуром болеют парнокопытные, а сапом – однокопытные, кошачьи; инфекционной анемией – лошади, чумой свиней – свиньи. Однако и в пределах вида патогенность микроорганизмов может колебаться.

Степень патогенности, индивидуальная особенность каждого варианта и штамма микроорганизмов называется вирулентностью. Вирулентность – это индивидуальный, штаммовый признак: степень реализации патогенности вида каждым конкретным штаммом по отношению к конкретному хозяину.

Степень вирулентности конкретного штамма патогенного вида микроорганизма можно оценивать по:

- а) клиническому течению инфекционного процесса;
- б) на модели *in vivo* – путём воспроизведения экспериментальной инфекции на животных;
- в) на модели *in vitro* – путём качественного и количественного изучения факторов вирулентности конкретного штамма.

На модели экспериментальной инфекции проводят количественную оценку вирулентности штамма, используя условно-принятые единицы измерения вирулентности: LD₅₀, т.е. количеством микроорганизмов или микрограммов токсина, вызывающим гибель 50% подопытных особей и DLM – наименьшее кол-во микробных клеток, способное вызвать гибель 95% животных восприимчивого вида при определённом способе заражения и в течение заданного времени.

Вирулентность возбудителя можно регулировать как в сторону её снижения так и повышения (Кальметт и Жерен, картофельно-глицериновые среды с жёлчью, 13 лет, 230). Снижение вирулентности называется аттенуацией – ослаблением.

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Классификация зависит от их структуры, происхождения, механизма действия и назначения.

1. Структурные компоненты бактериальной клетки

1.1. Капсула образуется вирулентными штаммами как фактор защиты бактериальной клетки от воздействия фагоцитов и антител организма, капсула выполняет функцию экрана для возбудителя в отношении иммунной системы организма. Она тормозит

фагоцитарный процесс (*B. anthracis*), в ряде случаев вызывает гибель фагоцитов (*S. aureus*).

1.2. *Пили* - (ворсинки, фимбрии) образуются вирулентными штаммами бактерий. Пили белковой природы являются факторами адгезии, обеспечивая прикрепление возбудителя к чувствительным клеткам хозяина.

Адгезивность хорошо выражена у эшерихий, которые продуцируют соответствующие белковые вещества, позволяющие бактериям прикрепляться к слизистой тонких кишок, накапливаться здесь в больших количествах, продуцировать токсины и поражать организм. Протеины наружной мембраны *E. coli* обеспечивают ей устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови.

1.3. *Пептидогликан* (муреин, мукопептид) - основной полимер клеточной стенки грампозитивных и грамнегативных бактерий. В химическом отношении это гетерополимер, состоящий из гликановых цепей, перекрестно связанных посредством коротких пептидов.

Пептидогликан (*S. aureus*) выполняет функцию фактора микробной вирулентности, подавляя иммунные реакции хозяина, так как резко тормозит миграцию лейкоцитов, вызывает лизис тромбоцитов и пирогенное действие (подъем температуры).

1.4. *Липополисахариды* (ЛПС) содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий (эшерихий, шигелл, сальмонелл, бруцелл и др.). ЛПС являются эндотоксинами, так как становятся активными после разрушения бактериальной клетки. Обладают пирогенным действием, угнетают фагоцитоз, вызывают гипотонию. Большое количество поступившего в кровь эндотоксина приводит к токсико-септическому шоку. Гликолипид является основным фактором вирулентности туберкулезной палочки (корд-фактор). Корд-фактор оказывает токсическое действие, разрушая митохондрии клеток организма.

2. Секретируемые факторы

Известна группа микробных секретируемых факторов вирулентности, участвующих в инфекционном процессе: бактериоцины, экзотоксины, ферменты «защиты и агрессии», секретируемые факторы персистенции.

2.1. *Бактериоцины* - белки, медиаторы межмикробного взаимодействия, секретируются бактериальной клеткой в качестве антагонистически активных веществ. Бактериоцины выделяются в условиях близкородственного антагонизма внутри вида, рода бактерий. Бактериоцины обеспечивают колонизацию вирулентным штаммом определенного биотопа, подавляя нормальную микрофлору: колицины *Shigella flexneri* подавляют *E. coli*.

2.2. *Экзотоксины* - вещества белковой природы, секретируемые вирулентными штаммами микроорганизмов в качестве продуктов обмена в окружающую среду (организм животного, пробирка с питательной средой) и оказывающие токсическое действие на клетки и ткани организма хозяина.

Сравнительная характеристика бактериальных экзотоксинов и эндотоксинов представлена в таблице. Экзотоксины секретируются живой бактериальной клеткой в основном грамположительными, являются белками, полностью инактивируются под действием высокой температуры (90-100°C). Они обезвреживаются формалином в концентрации 0,3-0,4 % при 37 °C в течение 3-4 недель, при этом сохраняют свою антигенную специфичность и иммуногенность, т. е. переходят в вакцину-анатоксин (столбнячный, дифтерийный, ботулиновый, стафилококковый и др.).

2.2.1. Гемолизины – экзотоксины, разрушающие эритроциты крови.

2.2.2. Лейкоцидин – парализует активность лейкоцитов и разрушает их.

2.2.3. Нейротоксин – поражаенервную систему. Например, тетанолизин столбнячного микробы, ботулинический нейротоксин.

2.2.4. Энтеротоксины – вызывают расстройство ЖКТ, диарею.

2.2.5. Некротоксин – вызывает омертвение ткани, тормозит теплорегуляцию, понижает температуру тела.

2.3. Эндотоксины – образуются в результате распада микробной клетки (ЛПС, пептидогликан, тейхоевые и липотеихоевые кислоты). Хорошо изучены эндотоксины энтеробактерий (эшерихии, сальмонеллы, бруцеллы). Некоторые бактерии одновременно образуют как экзо-, так и эндотоксины (холерный вибрион, кишечная палочка и др.).

Как и вирулентность, сила действия токсинов измеряется величиной летальных доз DLM, LD₅₀, определяемые на животных.

Эндотоксины в отличие от экзотоксинов, характеризуются меньшей специфичностью действия и менее ядовиты по сравнению с экзотоксинами. Эндотоксины всех грамотрицательных бактерий угнетают фагоцитоз, вызывают падение сердечной деятельности, гипотонию, повышение температуры, гипогликемию.

2.4. *Ферменты*. Ферменты вирулентности образно делят на две группы: «защиты и агрессии».

2.4.1. Ферменты защиты обеспечивают устойчивость патогена к иммунитету хозяина:

- фермент коагулаза свертывает плазму крови, вследствие чего вокруг бактериальной клетки образуется защитная капсула (кишечная палочка, *S. aureus*);

- протеазы иммуноглобулинов разрушают антитела.

2.4.2. Ферменты агрессии обеспечивают распространение патогена по организму, разрушают структуры клеток и тканей организма:

- гиалуронидаза разрушает соединительную ткань, способствуя проникновению вглубь лежащие ткани патогена (*S. aureus*, бруцеллы, клостридии),

- нейраминидаза расщепляет сиаловые кислоты оболочек клеток, разжижает носовой секрет (пастереллы, вибрионы),

- фибринолизин растворяет сгустки фибрин (иерсинии, гемолитические стрептококки и стафилококки),

- ДНК-аза разрушает нуклеиновые кислоты,

- эластаза расщепляет лизоцим клеток организма.

Ферменты метаболизма бактерий, вызывающие образование токсических веществ при расщеплении субстратов организма, также рассматривают в качестве ферментов вирулентности:

- микробная уреаза - при гидролизе мочевины образует токсические вещества;

- декарбоксилаза - при разрушении белка способствует накоплению биогенных аминов.

2.5. Секретируемые субстанции. По химической природе в основном протеазы, расщепляющие специфический субстрат хозяина, который в норме обеспечивает защиту от патогена. Например, способность патогена инактивировать лизоцим определена как антилизоцимная активность. Этот фактор встречается у большого количества микроорганизмов от 88 до 100%.

Таким образом, факторы вирулентности приводят основные системы организма к дисфункции, в силу чего он погибает. Вирулентный штамм может обладать одним-двумя факторами вирулентности и этого окажется достаточно, чтобы ослабить резистентность организма и вызвать его гибель.

3. Виды инфекции.

Классифицируют различные формы инфекционного процесса.

1. По происхождению инфекции делят на **экзогенные** и **эндогенные**, или **автоинфекции**.

Экзогенная инфекция возникает при попадании возбудителя в организм извне.

Эндогенная (оппортунистическая) инфекция вызывается ассоциативными представителями нормальной микрофлоры при снижении защитных сил организма (иммунодефицитные состояния). Возбудители эндогенной инфекции относятся к условно-патогенным видам микроорганизмов. Эндогенная инфекция может развиться и при

перемещении микроорганизмов из одного биотопа человека в другой за счет искусственного переноса руками, инструментами либо естественного перехода микроорганизма - его транслокации (миграции).

2. По локализации патогена в организме различают **местную** и **генерализованную** формы инфекции.

Местная, или очаговая, инфекция имеет место, когда возбудитель локализуется в определенном органе либо ткани и не распространяется по организму, например возбудитель туберкулеза в легочной ткани.

При генерализованной инфекции патоген распространяется по организму, преодолевая различные защитные барьеры. Кровь является одним из частых путей распространения патогена это - гематогенный путь. Если возбудитель, распространяясь по крови, не размножается в ней, то такое явление называют **бактериемией**. В случае, когда бактерии размножаются в крови, развивается одна из тяжелых форм генерализованной инфекции – **сепсис** (при сибирской язве, роже свиней, колибактериозе и др). Сепсис может перейти в **септикопиемию**, когда патоген размножается во внутренних органах, вызывая в них образование гнойных очагов воспаления (при мыте лошадей, вызываемом стрептококком). При высокой концентрации бактерий и их токсинов в крови может развиться токсико-септический шок за счет массивного поступления токсинов.

3. Инфекционный процесс классифицируется в зависимости от числа проникших в организм видов патогена.

- **Моноинфекция** вызывается патогеном одного вида (туберкулез, дифтерия).
- **Смешанная (микст) инфекция** - одновременное заражение двумя и более видами возбудителей и развитие сразу нескольких заболеваний.
- **Реинфекция** - повторное заражение тем же видом возбудителя после выздоровления. Реинфекция возможна при заболеваниях, после которых не возникает стойкий иммунитет
- Если повторное заражение происходит тем же возбудителем до выздоровления, то возникает **суперинфекция**.
- **Вторичная инфекция** возникает на фоне развивающегося первичного заболевания и вызывается другим видом возбудителя. Вторичная инфекция может быть экзогенной или эндогенной (чаще).

4. По длительности течения различают **острые** и **хронические** инфекции. **Острые** инфекции протекают непродолжительное время, их срок исчисляется днями, неделями (грипп, корь, холера, чума). Хронические инфекции протекают в течение нескольких месяцев, лет (брucеллез, туберкулез). При определенных условиях (неэффективное лечение) острые инфекции могут переходить в хронические ().

Хронические инфекции протекают в виде **ремиссии** и **рецидива**, которые сменяют друг друга. Ремиссия – временное улучшение состояния больного. Рецидив – возврат болезни. При хроническом инфекционном процессе возбудитель персистирует в организме хозяина, т.е. длительно паразитирует в его тканях и клетках.

5. По механизму передачи инфекционные болезни делятся на кишечные (колибактериоз, сальмонеллез), респираторные (туберкулез, оспа), кровяные (Кулихорадка, туляремия), инфекции кожных покровов и слизистых оболочек (столбняк, сибирская язва, ящур).

Возбудители **кишечных инфекций** передаются алиментарным путем (корма, вода, предметы ухода). **Инфекции дыхательных путей** распространяются воздушно-капельным, реже воздушно-пылевым путем. Для **кровяных инфекций** характерен трансмиссивный путь передачи через кровососущих насекомых (вши, клещи, комары, блохи и пр.).

Возбудители **кожных покровов и слизистых оболочек** передаются через предметы обихода, прямым контактом, например посредством укуса (бешенство) или половым путем (кампилобактериоз).

1.9 Лекция №9 (4 часа).

Тема: «Иммунитет и факторы врождённого иммунитета».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Определение. Классификация.
2. Неспецифической факторы защиты организма.

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение. Классификация.

Иммунитет - способ защиты организма от генетически чужеродной информации - антигенов экзогенного и эндогенного происхождения. Антигены экзогенного происхождения: микробы, трансплантат, лекарственные препараты и другие факторы внешней среды. Антигены эндогенного происхождения: измененные клетки организма (мутанты, старые клетки, опухолевые клетки). Иммунологический надзор - контроль за гомеостазом (постоянством состава) собственных клеток (антигенов) организма.

По происхождению различают два вида иммунитета: врождённый и приобретённый.

Врождённый, или видовой, иммунитет (наследственный, видовой, генетический): защита животного определённого вида от определённого возбудителя инфекционной болезни. В основе лежит отсутствие в клетках организма рецепторов и субстратов, необходимых для адгезии и размножения возбудителя; наличие веществ, блокирующих размножение патогенных микроорганизмов. Прочный, но не абсолютный (столбняк у лягушки путем согревания её в термостате). У новорождённых часто видовая устойчивость отсутствует. Не заболевая определённой болезнью животные могут быть носителем возбудителя и представлять опасность для других видов (человек – носитель вируса чумы собак).

Приобретенный иммунитет: ненаследственный, специфический (против определенного вида возбудителя), не всегда напряженный, ограничен по длительности.

Приобретенный естественный активный иммунитет формируется после разных форм инфекционного процесса: заболевания, бактерионосительства, латентной инфекции и др. (длительность - многие годы).

Приобретенный естественный пассивный иммунитет формируется у новорождённого путем передачи антител через плаценту или через кишечник с молозивом (колоstralный) (длительность - до 6 мес).

Приобретенный искусственный активный иммунитет формируется после вакцинации под действием антигенов (длительность от года до нескольких лет).

Приобретенный искусственный пассивный иммунитет формируется после введения лечебно-профилактических сывороток или иммуноглобулинов - готовых антител (длительность 2-3 нед).

Антимикробный иммунитет направлен против грибов, простейших, бактерий, вирусов.

Противовирусный иммунитет имеет особенности в связи с внутриклеточным паразитированием вирусов.

Антитоксический иммунитет направлен на нейтрализацию экзотоксинов микроорганизмов. Клеточные и гуморальные механизмы иммунитета связаны с функцией иммунокомпетентных клеток.

2. Неспецифической факторы защиты организма.

Под неспецифическими факторами защиты понимают врождённые внутренние механизмы поддержания генетического постоянства организма, обладающие широким диапазоном противомикробного действия. Именно неспецифические механизмы вступают в качестве первого защитного барьера на пути внедрения инфекционного агента.

Неспецифические механизмы не нуждаются в перестройке, в то время как специфические агенты (антитела, сенсибилизированные лимфоциты) появляются спустя несколько дней. Важно отметить, что неспецифические факторы защиты действуют против многих патогенных агентов одновременно.

Среди основных *анатомо-физиологических барьеров* естественной защиты организма при инфекции выделяют:

- 1) **кожу и слизистые оболочки (наружный барьер), нормальную микрофлору;**
- 2) **лимфатические узлы, клетки РЭС, воспаление;**
- 3) **гематоэнцефалический барьер;**
- 4) **кровь - клеточные и гуморальные факторы.**

1. **Кожа** не только является механическим барьером для патогена, но и обладает бактерицидным действием за счет секретов сальных и потовых желез. Чистота кожи повышает ее бактерицидность. Повреждение кожи является условием для развития раневых инфекций: газовой гангрены, столбняка, бешенства.

Слизистые оболочки обеспечивают защиту не только как механический барьер за счет слизи, целостности эпителиального покрова, функции ворсинок. Эпителиоциты слизистых оболочек и железы разных биотопов выделяют на поверхность бактерицидные секреты: слону, слезную жидкость, желудочный сок, сок тонкой кишки, вагинальный секрет, лизоцим и др. При нарушении барьерной функции слизистые оболочки становятся входными воротами инфекции

Важная роль в защите биотопов организма от патогена отводится **нормальной** (резидентной, индигенной) **микрофлоре**. Одними из основных представителей нормальной микрофлоры толстой кишки являются кишечная палочка и бифидобактерии; кожи - эпидермальные стафилококки.

Защитная роль нормальной микрофлоры состоит в выделении антагонистически активных веществ (антибиотиков, бактериоцинов, микроцинов), подавляющих патоген, его способность колонизировать кожу, слизистые оболочки. Нормальная микрофлора образует пленку в биотопе. Кроме защитного антагонизма известны детоксицирующая, иммуностимулирующая и витаминообразующая функции нормальной микрофлоры, ее участие в пищеварении. Подавление нормальной микрофлоры вследствие заболевания или широкого применения антибиотиков приводит к формированию дисбактериоза, который может стать причиной развития различных форм патологии, в том числе микробного генеза. Для профилактики и лечения дисбактериоза используются пробиотики - препараты, содержащие живые антагонистически активные штаммы, представители нормальной микрофлоры организма (coliбактерин, бифидумбактерин, лактобактерин), бациллы (споробактерин) и др.

2. Второй защитный барьер организма включает **функцию лимфатических узлов, клеток ретикулоэндотелиальной системы (РЭС)**, развитие **воспаления**. Лимфатические узлы выполняют барьерфиксирующую функцию, могут длительно задерживать патоген, не пропуская его проникновения в кровь. За счет лимфатических узлов предотвращается развитие генерализованной формы инфекции.

Печень, селезенка, эндотелий кровеносных сосудов за счет клеток РЭС представляют собой своеобразные фильтры, в которых «застревают» патогены и таким образом не допускается генерализация инфекции.

Воспаление в своей основе является защитной реакцией организма, так как в результате воспалительной реакции вокруг патогена концентрируются специализированные клетки, которые должны либо уничтожить возбудителя, либо ограничить его распространение. Например, при гнойном мастите стафилококковой этиологии в ткани молочной железы образуется локальный гнойный очаг (абсцесс), предотвращающий генерализацию стафилококковой инфекции.

3. Гематоэнцефалический, который защищает ткань мозга (головного, спинного) от поражения патогеном. В защитные структуры гематоэнцефалического барьера входят оболочки мозга, стенки кровеносных сосудов, питающих мозговую ткань.,

4. Четвертая достаточно мощная, преграда на пути распространения патогена по организму - кровь. **Бактерицидная активность крови**, т.е. ее способность к самоочищению, обеспечивается комплексом гуморальных и клеточных факторов естественной резистентности организма. Если кровь перестает выполнять свою бактерицидную функцию, то возбудитель беспрепятственно пребывает и размножается в крови, а через нее проникает в разные органы и ткани и локализуется в них. В таких случаях развиваются тяжелые, генерализованные формы инфекции, сепсис и септикопиемия, которые создают реальную угрозу жизни организма-хозяина.

К **клеточным** факторам неспецифической защиты относится фагоцитоз, который осуществляют полиморфно-ядерных и мононуклеарных фагоцитов. Полиморфно-ядерные фагоциты представлены нейтрофилами (микрофагами), которые находятся в крови, концентрируются в очаге гнойного воспаления. Более разнообразна и многочисленна группа мононуклеарных фагоцитов - моноцитов (макрофагов).

Фазы фагоцитарного процесса.

1. Хемотаксис и прилипание (адгезия) частиц к поверхности клетки.
2. Постепенное погружение (захват) частиц в клетку с последующим отделением части клеточной мембранны и образованием фагосомы.
3. Слияние фагосомы с лизосомами.
4. Ферментное переваривание захваченных частиц и удаление оставшихся микробных элементов.

Эффективность фагоцитоза резко возрастает, если бактерии покрыты специфическими белками – опсонинами – белками нормальной сыворотки крови.

Фагоцитоз, при котором происходит гибель фагоцитированного микробы – завершенный.

Иногда микроорганизмы, находящиеся внутри фагоцита, не погибают, а иногда даже и размножаются – это незавершенный фагоцитоз.

Естественные (натуральные) **киллеры** - особая популяция гранулосодержащих лимфоцитов, обладающих цитотоксическим действием против чужеродных клеток: бактерий, простейших; клеток, пораженных вирусом; опухолевых клеток.

К **гуморальным факторам** неспецифической защиты относят ряд веществ, растворённых в жидкостях организма:

Комплемент – это многокомпонентная система белков сыворотки крови и других жидкостей организма. Система комплемента состоит не менее чем из 11 различных белков, получивших название от C_1 до C_9 . Существует два пути активации комплемента: классический, при котором первый компонент комплемента связывается с иммунным комплексом $Ag-At$, куда включаются последовательно остальные компоненты и в итоге происходит повреждение клеточной стенки и лизис бактериальной клетки. При альтернативном пути активаторами служат сами вирусы, бактерии и экзотоксины.

Дефенсины - семейство низкомолекулярных катионных белков с молекулярной массой около 4 кДа. Они содержатся в азурофильтальных гранулах нейтрофилов, в большом количестве присутствуют в клетках кишечника. Это - древнейший механизм защиты организма. Подобно другим компонентам первичных гранул дефенсины не только могут высвобождаться в фагосому, но и секретироваться во внеклеточное пространство. Убивают микроорганизмы, разрушая их внешние мембранны.

Лактоферрин - железосвязывающий белок, присутствующий в специфических гранулах фагоцитов и в секретах слизистых оболочек. Бактериостатический эффект лактоферрина обусловлен его способностью лишать бактерии железа, необходимого для роста.

Лизоцим содержится в основном в специфических гранулах, но присутствует также и в азурофильтальных. Он гидролизует связь между компонентами пептидогликана клеточной стенки бактерии.

Свои бактерицидные и цитотоксические (по отношению к эукариотическим клеткам) свойства **нейтрофилы** могут оказывать не только путем фагоцитоза. Не меньшую роль играет и внеклеточный киллинг за счет выброса наружу так называемых «ловушек» - токсических продуктов, которые обезвреживают микроорганизмы, расположенные за пределами фагоцита.

Тромбоцитарный катионный белок. Основные продуценты - тромбоциты. Мишенью действия является мембрана бактериальной клетки.

1.10 Лекция №10 (2 часа).

Тема: «Инфекционный иммунитет».

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Виды инфекционного иммунитета, их характеристика.
2. Природа, свойства, классификация антигенов.
3. Животные и микробные антигены.

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Виды инфекционного иммунитета, их характеристика.

В современном понимании иммунитет к заразным болезням подразделяется на **врожденный** (он же наследственный или видовой) и **приобретенный** (или индивидуальный). Врожденный, наследуется как любой другой биологический признак, потомством от родителей. В основе врожденного иммунитета лежит отсутствие на поверхности клеток рецепторов для адгезии патогенных микроорганизмов.

Приобретенный иммунитет касается защиты от тех вирулентных паразитов, которые способны преодолевать конститутивные защитные барьеры (непроницаемость покровов, фагоцитоз, комплемент, воспаление) организмов конкретного вида. Такого рода защита возникает только в результате контакта с инфекционным началом и у каждой особи данного вида независимо от других, поэтому его и называют *индивидуальным*. В формировании такого иммунитета основную роль играют иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты). Опираясь на достижения медицины, микробиологии и иммунологии, люди получили возможность направленно вызывать приобретенный иммунитет к инфекционным заболеваниям, поэтому в настоящее время его принято делить на естественный и искусственный.

Искусственный иммунитет можно вызвать двумя основными путями. Первый предполагает введение в организм вакцинальных препаратов. При введении живых вакцин формируется достаточно длительный иммунитет сроком до года и более. Вероятно, это объясняется сохранением живой клеткой или вирусной частицей большинства антигенов, на которые способна реагировать иммунная система, что и делает иммунный ответ наиболее широким по набору антител и клеток иммунологической памяти, следовательно, более полноценным. Второй путь предполагает введение препаратов, содержащих не разрушенные, но лишенные жизнеспособности клетки или вирусные частицы возбудителя, так называемых *убитых вакцин*. При их введении формируется иммунитет длительностью до 6 месяцев.

Создаваемый с помощью вакцин искусственный иммунитет, называют активным, поскольку в организме вакцинируемых в результате развивающегося иммунного ответа вырабатываются антитела или появляются активированные ЦТЛ.

Вторая же форма искусственного иммунитета, так называемый *пассивный (сывороточный) иммунитет*, создается путем введения в организм уже готовых, выработанных в другом организме антител против конкретного возбудителя. Он

формируется в течение нескольких часов и длится до 15 дней, поскольку введенные антитела постепенно разрушаются в плазме крови, а собственных антител, способных защитить от данного возбудителя, организм не вырабатывает.

Для профилактики инфекционных болезней применяют обе формы искусственного иммунитета, но активный искусственный иммунитет имеет гораздо более широкое распространение.

Естественный иммунитет возникает без вмешательства человека и также представлен двумя формами. Возникающая после перенесенного заболевания невосприимчивость к некоторым болезням, называется *постинфекционным иммунитетом* или *естественным активным иммунитетом*, имеет в своей основе развитие у болеющего иммунного ответа, приводящего к формированию и длительному (иногда на всю оставшуюся жизнь) сохранению в организме соответствующих клеток иммунной памяти.

Естественный пассивный иммунитет возникает при попадании в организм антител, продуцируемых другим организмом. Это происходит в период внутриутробного развития у млекопитающих. Установлено, что IgG способны преодолевать плацентарный барьер и поступать в кровоток плода – в результате чего идет формирование *плацентарного иммунитета* (особенно интенсивно это происходит в последние месяцы беременности). Другой путь попадания антител – с молозивом, что ведет к формированию *колострального иммунитета*. Для основных видов сельскохозяйственных животных наиболее актуален последний. Обе эти разновидности естественного пассивного иммунитета делятся всего несколько месяцев, т. к. материнские антитела постепенно выводятся из организма.

2. Природа, свойства, классификация антигенов.

Слово «антиген» происходит от широко используемых в современных языках древнегреческих *анти* – противоположный, и *генез* – рождающий. В начальный период развития иммунологии под антигеном всегда однозначно понимали организмы или вещества, имеющие отношение к инфекционным заболеваниям. Однако, последующие открытия в области иммунологии, изменили этот взгляд.

В настоящее время определение звучит следующим образом: «*Антиген (АГ) – это чужеродное вещество, которое при попадании в организм вызывает развитие иммунных реакций и специфически взаимодействует (связывается) с продуктами этих реакций*».

В настоящее время благодаря открытию механизмов развития иммунных реакций стало понятно, что антигенами могут являться практически любые вещества, имеющие достаточную молекулярную массу в сочетании с определенной пространственной структурой. Для АГ характерно наличие следующих основных свойств: *иммуногенности; антигенности; специфичности; чужеродности*. Под иммуногенностью понимают способность АГ вызвать иммунный ответ при введении во внутреннюю среду другого организма, не имеющего дефектов иммунной системы. *Антигенность* – это способность вызывать иммунный ответ в большей или меньшей степени. *Специфичность* – это свойство, характерное для каждого конкретного АГ, обусловлена *антигенными детерминантами* или *эпитопами*. Это пространственные структуры на поверхности антигена, которые распознаются АТ и с которыми они взаимодействуют. *Неполные антигены* или *гаптены* вызывать синтез антител не могут, но с готовыми вступают в реакцию.

3. Животные и микробные антигены.

Животные антигены классифицируются по их отношению к организму, в котором они вызывают иммунный ответ. При таком подходе принято выделять:

- *автоантигены* – собственные антигены организма, на которые по тем или иным причинам отреагировала иммунная система;

- *изоантигены* – антигены генетически идентичных организмов;
- *гомо- (алло-)* *антигены* – антигены разных особей одного и того же вида;
- *гетеро- (ксено-)* *антигены* – антигены особей любого другого вида.

При необходимости подчеркнуть характер развивающегося в организме ответа на антиген используют термины *тимусзависимые* и *тимуснезависимые* антигены, указывая на участие или неучастие в иммунном ответе Т-лимфоцитов.

Применительно к используемым в медицинской практике пересадкам органов и тканей появился термин *трансплантиционные антигены*. В настоящее время, когда причины и механизмы отторжения пересаженных тканей частично выяснены, под этим термином фактически понимают располагающиеся на поверхности клеток белки главного комплекса гистосовместимости (МНС). Наличие таких антигенов позволяет отличать один организм от другого (за исключением однояйцевых близнецов), т. е. они определяют *индивидуальную антигенную специфичность*. АГ МНС относятся к 3 классам. АГ МНС I класса располагаются на всех ядросодержащих клетках организма и участвуют в представлении чужеродного АГ цитотоксическим лимфоцитам (Т-киллерам). АГ МНС II класса располагаются на поверхности профессиональных АПК (макрофагах, дендритных клетках, В-лимфоцитах) и участвуют в представлении чужеродного АГ Т-хеллерам.

В современной иммунологии, биологии и медицине широкое применяется понятие антигенной специфичности. Различают следующие виды антигенной специфичности:

- *видовая специфичность* – имеется в виду наличие антигенов, характерных для всех особей вида и нехарактерных для организмов других видов;

- *гетероспецифичность (гетерогенная или ксеногенная специфичность)* – наличие у организмов разных видов одинаковых или сходных антигенных детерминант (например, у стафилококков и стрептококков есть антигены, частично совпадающие с антигенами сарколеммы сердечной мышцы человека; у некоторых вариантов вируса гриппа сходные АГ с АГ эритроцитов людей, что называют «антигенной мимикрией»).

Каждый микроорганизм, как бы примитивно он не был устроен, содержит несколько антигенов. Чем сложнее он устроен, тем больше антигенов можно обнаружить.

У различных микробов, принадлежащих к одним и тем же систематическим категориям различают:

- группоспецифические антигены – встречаются у разных видов одного и того же рода или семейства;

- видоспецифические антигены – встречаются у представителей одного вида;
- типоспецифические (вариантные) антигены – встречаются у разных
 - вариантов в пределах одного и того же вида.

Среди бактериальных антигенов различают: Н-АГ; О-АГ; К-АГ; С-АГ и другие.

Жгутиковые Н-антигены. Эти антигены входят в состав бактериальных жгутиков. По химической природе – белки (белок флагеллин), термолабильны, после обработки фенолом сохраняют свои антигенные свойства.

Соматический О-антителен. Этот антиген связан с клеточной стенкой (раньше полагали, что связан с внутренним содержимым – сомой). О-антителен грамотрицательных бактерий связан с ЛПС клеточной стенки. О-антителен термостабилен (при кипячении сохраняется в течение 1-2 часов), не разрушается после воздействия формалином и этиловым спиртом.

Капсулевые К-антигены. Тесно связаны с клеточной стенкой и капсулой. Представлены кислыми полисахаридами. По чувствительности к температуре К-антигены подразделяются на А-, В- и L-антигены.

Экзотоксины большинства микроорганизмов обладают свойством полноценных антигенов.

Антигенными свойствами обладают также споры.

Среди бактериальных антигенов выделяют *защитные или протективные антигены*, на которые синтезируются защитные от данной инфекции антитела.

1.11 Лекция №11 (2 часа).

Тема: «Основные формы иммунного реагирования».

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Строение молекулы иммуноглобулина.
2. Классификация иммуноглобулинов, функции отдельных классов.
3. Фазы синтеза антител. Генетический контроль синтеза антител.

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

1. Строение молекулы иммуноглобулина.

Это одна из важнейших иммунных реакций. Считается, что если микроорганизм размножается вне клеток внутри макроорганизма, то будет развиваться гуморальный иммунитет (сиб. язва).

Антитела – это особый класс белков, называемый иммуноглобулинами, которые вырабатываются под действием антигенов и обладают способностью специфически с ними реагировать.

К иммуноглобулинам относятся антитела сыворотки крови, секреторные антитела слизистых оболочек, специфические рецепторы на клетках иммунной системы. Секреторные IgA(SIgA) в отличие от сывороточных концентрируются на эпителиоцитах слизистых оболочек и играют существенную роль в местном иммунитете.

При этом антитела могут нейтрализовать токсины, осаждать растворимый антиген – преципитины. Антитела, которые могут склеивать корпускулярные антигены – агглютинины. Антитела, повышающие фагоцитарную активность лейкоцитов – опсонины; а если блокируют антигены – блокирующие антитела. Различают пять классов Ig: IgA, IgM, IgG, IgE, IgD.

Структура иммуноглобулинов. Химическая структура молекулы Ig представлена полипептидными цепями, соединенными дисульфидными мостиками, и углеводами.

Строение иммуноглобулинов у животных и человека схоже. Ig всех классов состоят из четырёх полипептидных цепей: двух тяжёлых H-цепи и двух лёгких – L-цепи. L-цепи у всех одинаковые, а H-цепи разные. Обозначаются буквами греческого алфавита: мю, гамма, альфа, дета, эта. IgM имеют звёздчатую структуру, а остальные – V-образную.

В природе существует около 100 тысяч антигенов, на каждый из которых вырабатываются антитела.

Активный центр состоит из вариабельных областей лёгких и тяжёлых цепей. В цепях имеются и постоянные области. Активный центр обеспечивает уникальность иммуноглобулинов. Активный центр – это полость или щель, повторяющая структуру антигенного детерминанта. В зависимости от количества активных центров антитела имеют разную валентность. IgM имеют 10 активных центров, а остальные – по 2.

Активность связывания антител и антигена характеризуется двумя понятиями:

- аффинитет – уровень или степень совпадения активного центра и антигенной детерминантой;
- avidность – характеризует жадность связывания антигена и антитела, что зависит от количества и расположения активных центров.

Антитела классифицируют по количеству активных центров на полные и неполные. Полные антитела имеют два и более активных центра, а неполные - один активный центр.

2. Классификация иммуноглобулинов, функции отдельных классов.

IgM – молекулярная масса 900000 D, 19S, пентамер (мономеры соединены J-цепью, десятивалентен), составляет 6% от всех Ig, средняя концентрация в сыворотке составляет 0,5-4 г/л, период полужизни составляет 5 дней. Способен агглютинировать, преципитировать, лизировать АГ, а также связывать комплемент. Первым появляется

после заражения или вакцинации (первичной) и доминирует при первичном иммунном ответе.

IgG – молекулярная масса составляет 150000 D, 7S, мономер (двувалентен), составляет до 80% от всех Ig, в сыворотке содержится в самой высокой концентрации – от 5 до 15 г/л, период полужизни составляет 23 дня. Способен агглютинировать, лизировать (с участием комплемента), нейтрализовывать токсины и вирусы, проходить через плаценту. Доминирует при вторичном иммунном ответе. У человека имеется 4 подкласса: IgG1 - 66 %, IgG2 – 23%, IgG3 – 7%, IgG4 – 4%. Концентрация IgG у детей достигает уровня взрослых только к 8 годам.

IgA – молекулярная масса мономера – 160000D, димера – 400000D, в сыворотке крови содержится в концентрации 0,5-3,5 г/л, на его долю приходится до 13% от всех Ig, период полужизни – 6 дней. Это основной класс антител в секретах (молоке, слюне, слезах, секретах дыхательных путей, пищеварительного и урогенитального трактов). У человека существует 2 подкласса - IgA1 и IgA2. Они различаются по Н-цепям. В составе секретов IgA представлен димером (A1 или A2, мономеры соединены J-цепью). Этот димер имеет еще и секреторный компонент, вырабатываемый эпителиальными клетками действующий как рецептор в транспорте IgA через эпителиальные клетки, кроме того, он защищает IgA от протеолиза.

Основная функция IgA – препятствовать проникновению в организм через слизистые оболочки различных антигенов и ингибировать колонизацию эпителия бактериями и вирусами, т.е препятствует адгезии и адсорбции микроорганизмов.

Особенно велика роль секреторного иммуноглобулина, содержащегося в молоке, для новорожденных. Поэтому не случайно из всех секретов молоко наиболее богато ими. В молоке IgA в 5 раз больше, чем в слюне и в 58 раз больше, чем в бронхоальвеолярной жидкости.

Ig D – молекулярная масса составляет 180000D, коэффициент седиментации - 7S, мономер, на его долю приходится 0,2 % от всех Ig, концентрация в сыворотке крови составляет от 0,00..... до 0,04 г/л, период полужизни – 3 дня. Этот класс не агглютинирует, не преципитирует, не лизирует. Выполняет роль рецептора на поверхности В-лимфоцитов. Но до конца его роль еще не выяснена.

IgE – молекулярная масса 200000 D, мономер, составляет 0,002 % от всех Ig, концентрация в сыворотке крови составляет от 0,00.... до 0,00002 г/л, период полужизни – 3 дня. После секреции плазматическими клетками он связывается с тучными клетками и базофилами. Участвует в аллергических реакциях (при этих состояниях концентрация его может увеличиваться до 1,6 г/л), а также в противопаразитарном иммунитете.

3. Фазы синтеза антител. Генетический контроль синтеза антител.

Различают две фазы гуморального иммунитета – индуктивную и продуктивную.

Под **индуктивной фазой** гуморального иммунитета понимают процессы, в течение которых В-лимфоциты получают ряд сигналов для своей пролиферации и дифференцировки. Различают два механизма включения В-лимфоцитов – Т-зависимый и Т-независимый. Первый требует участия активированных Т-хеллеров (в качестве антигенпредставляющих клеток выступают активированные антигеном В-лимфоциты), которые дифференцируются в Тх-2 и секретируют цитокины, необходимые для дальнейшего развития и дифференцировки В-лимфоцитов (ИЛ-4, 5, 6, 10, 13).

При Т-независимом пути Т-хеллеры не участвуют. Тимуснезависимые антигены связываются на поверхности лимфоцита одной своей частью с ВкР, а другой – с рецепторами для митогенов. При накоплении достаточного их уровня на поверхности клетки, включается митогенный сигнал, который инициирует пролиферацию и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки. Другие антигены имеют строение цепей с периодически повторяющимися фрагментами. Это способствует многоточечному связыванию рецепторов на поверхности В-лимфоцитов, которые и обуславливают

включение митогенного сигнала. В дальнейшем, после нескольких стадий деления, наступает продуктивная фаза.

Под **продуктивной фазой** гуморального иммунного ответа понимают процессы, в результате которых образуются эффекторные клетки – плазматические клетки, продуцирующие антитела, а также В-клетки памяти.

Эти процессы происходят во вторичных фолликулах лимфатических узлов и в белой пульпе селезенки.

Основной же механизм дифференцировки В-лимфоцитов – это переключение синтеза мембранных иммуноглобулинов (ВкР) на растворимые молекулы, секретируемые во внеклеточное пространство. Секретируемые антитела имеют ту же специфичность, что и ВкР.

Синтез различных цепей иммуноглобулинов происходит на полирибосомах

Плазматической клетки, сборка идет на мембранах комплекса Гольджи. Зрелая плазматическая клетка не делится и продуцирует антитела одной специфичности. Продолжительность жизни составляет 4-7 суток, после чего подвергается апоптозу.

Важную роль в процессе антителообразования отводят переключению классов антител. Обычно на начальных этапах первичного иммунного ответа синтезируются в основном Ig M. Они появляются на 2-3 день после введения антигена. На более поздних этапах появляются IgG, IgA, IgE. Переключение на выработку этих более специфичных антител, обладающих более выраженным аффинитетом, осуществляется на уровне клеток-предшественников антителопродуцентов. При этом вначале изменяется класс мембранных рецепторов (ВкР). И при переключении на синтез секретируемых иммуноглобулинов класс антител больше не меняется.

Для реализации переключения необходимо присутствие цитокинов:

ИЛ-4,5,6 – для переключения на синтез IgG;

ИЛ – 4, 13 – для переключения на синтез IgE;

ИЛ – 5, 10 – для переключения на синтез IgA.

1.12 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Возбудители стафилококков».

1.12.1 Вопросы лекции:

1 Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств стафилококков.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика стафилококков.

1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1 Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств стафилококков.

Стафилококкозы – это инфекции, вызываемые патогенными стафилококками, характеризующиеся преимущественно гноеродными процессами различной локализации, проявляются в виде абсцессов, флегмон, маститов, метритов, пневмоний, сепсиса. Токсигенные штаммы стафилококков могут вызывать пищевые отравления у людей.

Стафилококки относятся к роду *Staphylococcus*, семейству *Micrococcaceae*. Данный род включает 19 видов, из которых в патологии наибольшее значение имеют следующие 3 вида: *St.aureus*, *St.epidermidis*, *St.saprophyticus*.

Морфология. Клетки стафилококков грамположительные, сферической формы, диаметром 0,5... 1 мкм, располагаются в виде скоплений неправильной формы, а также единично, парами и цепочками из трех-четырех клеток спор нет, вирулентные штаммы могут образовывать капсулу.

Культивирование. Стафилококки — факультативные анаэробы, температурный оптимум 30...37 °С, рН 7,2...7,4, к питательным средам неприхотливы, могут расти при повышенном содержании хлорида натрия. Исследуемый материал высевают на МПА, в МПБ, посевы культивируют в условиях обычной атмосферы. При загрязнении материала посторонней микрофлорой используют питательные среды с селективными свойствами: солевые МПА, МПБ (8...10% хлорида натрия), желточно-солевой агар (ЖСА), 3,5%-й МПА с добавлением 3 мл 0,1%-го раствора кристаллиолета (на этой среде патогенные стафилококки образуют колонии фиолетового или оранжевого цвета). Широко используют посев исходного материала на кровяной МПА. На плотных средах через 18...24 часов инкубирования вырастают колонии правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, диаметром 2...7мм, непрозрачные. Цвет колоний зависит от типа вырабатываемого пигмента. *S. aureus* синтезирует золотистый и белый пигмент. На кровяном МПА вирулентные штаммы обычно растут, формируя широкую зону бета-гемолиза. На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком. В МПБ рост стафилококков сопровождается интенсивным помутнением среды и образованием значительного осадка.

Биохимические свойства. Восстанавливают нитраты, образуют H_2S , разлагают глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, глицерин, маннит с выделением кислоты; уреаза-положительны; крахмал не гидролизуют; индол не образуют.

Антигенные свойства. Видоспецифичными Аг являются тейхоевые кислоты; для *S.aureus* — рибиттейхоевые, для *S.epidermidis* — глицеринтейхоевые; у *S.saprophyticus* выявляют оба типа кислот.

Токсигенные свойства. Прикрепившиеся (адсорбированные) микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности начинают продуцировать целый комплекс экзо- и энтеротоксинов. Именно токсины обусловливают клинические проявления болезни. В настоящее время установлено более 30 различных продуктов стафилококка, обладающих свойствами токсинов и нарушающих нормальные физиологические реакции в организме хозяина. Подробно изучен ряд экзотоксинов (а; р; у; 5; е) - гемолизинов, лизирующих эритроциты, и ряд токсинов, лизирующих лейкоциты. Лизирующие токсины обладают довольно широким спектром действия, и их предлагают вообще называть цитолизинами. Лизирующее действие многих из них основано на способности вызывать гидролиз компонентов мембранны клеток.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика стафилококков.

Устойчивость во внешней среде. Стафилококки хорошо переносят высушивание, сохраняя вирулентность; погибают при прямом воздействии солнечного света в течение 10-12 ч. Довольно устойчивы к нагреванию — при 70-80 °С погибают за 20-30 минут, при 150 °С — за 10 минут; сухой жар убивает их за 2 ч. Менее устойчивы к действию дезинфектантов, но резистентны к воздействию чистого этанола. 14 из 27 известных видов обнаружены на коже и слизистых оболочках (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S.*

Патогенность. Одной из важнейших особенностей стафилококкоза является тот факт, что имеется выраженная индивидуальная чувствительность или устойчивость к этому возбудителю. Для того чтобы животное заразилось, оно должно либо обладать слабой сопротивляемостью к действию патогенного стафилококка либо доза заражения должна быть массивной. Динамика патогенетического процесса изучена недостаточно. Предполагается, что на первоначальном этапе патогенеза вирулентные штаммы стафилококка после проникновения в организм прикрепляются к клеткам-мишеням (преимущественно эпителия и дермы) с помощью факторов адгезии. Как правило, способность к адгезии (прикреплению) у стафилококков коррелирует с их

вирулентностью. Установлено, что функцию адгезии к клеткам эпителия выполняют термостабильные и трипсинрезистентные структуры. По мнению целого ряда исследователей, наиболее вероятными кандидатами на эту роль являются тейхоевые кислоты. Таким образом, в результате жизнедеятельности прикрепившихся к клеткам хозяина стафилококков вырабатывается целый ряд токсинов, которые лизируют клетки хозяина или нарушают их нормальную жизнедеятельность, приводя к гибели. В итоге развиваются воспалительные реакции, приводящие к клиническим симптомам дерматитов, отитов, вагинитов, пищевых отравлений (рвота, диарея) и т.д.

3. Лабораторная диагностика. Основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим, а также токсигенным признакам (методом биопробы).

Иммунитет и средства профилактики. Иммунитет развивается как гуморального, так и клеточного типа. Биопрепаратов не разработано.

1.13 Лекция №13 (2 часа).

Тема: «Возбудители колибактериоза».

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя колибактериоза.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика колибактериоза.

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя колибактериоза.

Колибактериоз - (колисептициемия, колиэнтерит, эшерихиоз, колиинфекция) – это остропротекающее инфекционное заболевание новорожденных животных в возрасте от 1 до 10 дней, болезнь характеризуется диареей, нарастающими симптомами интоксикации, сильным обезвоживанием организма и гибелью животных. У поросят отъемного возраста кишечная палочка вызывает отечную болезнь поросят, которая характеризуется летальностью в 100 случаев.

Классификация возбудителя. Возбудитель относится к семейству Enterobacteriaceae, роду *Escherichia*, виду - *Escherichia coli*. Впервые возбудителя инфекции выделил в 1885 году Теодор Эшерих из фекалий ребенка.

Морфология возбудителя. По морфологии *Escherichia coli* представляет собой полиморфную палочку с закругленными краями. Её размеры составляют в длину 1-3 мкм в ширину 0,5-0,6 мкм, окрашивается грамотрицательно (Гр-). Форма бактерий может изменяться и принимать вид коккобактерий. Спор не образует. Капсулу образуют только особо вирулентные штаммы бактерий (08, 09, 0101). На поверхности клеток имеются жгутики, а также реснички-пили. В организме зараженного животного возбудитель образует микрокапсулу, которую не всегда отчетливо видно при микроскопии.

Культуральные и биохимические признаки. Кишечная палочка является факультативным аэробом. Оптимальная температура для культивирования 30-37°C, pH 7,2-7,5. Она хорошо растет при комнатной температуре на обычных питательных средах (МПА, МПБ, МПЖ, агар Эндо и др.)

Температурный диапазон составляет 1-45°C. На МПА через 24 часа образует характерные плоско-выпуклые колонии мелкого и среднего размера (2-3 мм) с ровным краем (S-форма), с блестящей поверхностью, полупрозрачные, сероватого цвета. При длительном выращивании на искусственных питательных средах возникает диссоциированная форма (R-форма с шероховатым краем), сопровождающаяся утратой типичных свойств морфологических, культуральных и даже антигенных свойств. На МПБ образует обильный рост и пристеночное кольцо. На среде Эндо образуются малиновые колонии с металлическим блеском.

Биохимическая активность у эшерихий достаточно высокая. Они ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, манит, дульцит, арабинозу, сорбит и ксилозу, свертывает молоко. Не разжижает желатину, на белковых средах образует индол, не разлагает мочевину. Среди патогенных штаммов кишечной палочки встречаются гемолитические штаммы, которые разрушают эритроциты млекопитающих различных видов.

Антигенная структура. Общепризнанная серологическая классификация эшерихий, разработанная Ф. Кауфманом (1954), основана на анализе О-, К- и Н-антигенов. В 1963 году было известно 146 вариантов О-антигена, 88 вариантов К-антигена (Е.С. Станиславский, МИ. Жванецкая, 1963), к концу 80-х годов у эшерихий насчитывалась 171 серологическая разновидность О-антигена, более 100 разновидностей К-антигена и 60 разновидностей Н-антигена. По данным В.И. Покровского и соавт. (1999), установлено 173 О-серогруппы и 56 типов К-антигена *E.coli*, а также около 80 типов Н-антигена, однако лишь незначительная часть сероваров этих бактерий способна вызывать кишечные инфекции у животных и человека. О-антиген - термостабильный соматический, не разрушается при температуре 100°C в течение 2,5 ч и от действия алкоголя, сохраняя антигенную и агглютининсвязывающую способность. По химической природе он представляет липоидно-полисахаридный комплекс, который определяет серогрупповую специфичность штаммов и содержится в клеточной стенке. Разные серологические группы эшерихий отличаются друг от друга по составу концевого углевода полисахарида. К-антигены - поверхностные оболочечные или капсульные, обозначаемые латинскими буквами L, B и A. Большая часть их - кислые полисахариды, но имеются штаммы белковой природы (L-антигены) или различного химического состава. L-антигены термолабильны, разрушаются при 100°C в течение одного часа. B-антиген термолабилен, при 100°C утрачивает антигенные свойства, но сохраняет агглютинабельность в отличие от L-антигена.

A-антиген (капсульный) представляет собой полисахаридное соединение, термостабильный, при 100°C не разрушается в течение 2,5 ч, автоклавирование культуры эшерихий, содержащей A-антиген, при 1 атм (120°C) в течение 2 ч приводит к потере его антигенных свойств, но его агглютининсвязывающая способность сохраняется.

Помимо указанных К-антигенов некоторые штаммы эшерихий образуют адгезивные антигены, за счет которых они прикрепляются к клеткам энтероцитов, ворсинкам слизистой оболочки кишечника и колонизируются (размножаются) в них. Наличие антигена адгезии характеризует патогенность штамма. Адгезивные антигены имеют белковую природу, являются термолабильными и разрушаются при прогревании культуры бактерий в течение 1 ч при 100°C, теряя антигенные и агглютинабельные свойства. Обозначаются эти антигены латинскими буквами и арабскими цифрами. Н-антиген (жгутиковый) содержится у подвижных штаммов эшерихий, термолабильный, белковой природы. Один и тот же Н-антиген может встречаться у бактерий разных серогрупп.

Поверхностные (L,B,A) антигены препятствуют агглютинации бактерий соответствующей О-сывороткой, поэтому при серогрупповой типизации культур эшерихий их подвергают термической обработке: прогреванию в водяной бане или автоклавированию.

Сочетание О-, К- и Н-антител характеризует серологический вариант бактерий (серовар).

Согласно международным правилам о порядке размещения символов в антигенной формуле эшерихий, на первом месте указывается тип О, на втором - К и на третьем - тип Н-антитела. В антигенной формуле эти типы антигенов разделяются между собой двоеточием и каждый из них имеет порядковый номер, обозначаемый арабскими цифрами.

Ведущая роль в развитии диареи новорожденных поросят, телят и ягнят принадлежит энтеротоксигенным штаммам эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, F41, F18, A20, A125. Наиболее часто у телят вызывают заболевания штаммы эшерихий следующих серологических групп: 08, O9, O15, O20, O26, O35, O78, 086, O101, O115, O119, O141, реже - O2, O33, O41, O55, O103, O127, O137; у поросят - O8, O26, O33, O101, O138, O139, O141, O142, O149, O151, O157; у ягнят - O4, O8, O9, O15, O20, O26, O35, O41, O78, O101, O137; у птиц - O1, O2, O8, O15, O18, O26, O55, O78, O111, O115, O126, O141.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика колибактериоза.

Устойчивость. Во внешней среде *Escherichia coli* переживает в течение 3-4 месяцев. Низкие температуры консервируют возбудителя в течение 1 года (-20°C). При нагревании до +55°C - выживает в течение часа, +60°C - выживает в течение 15 минут. Дезосредства инактивируют *Escherichia coli* в течение 1 часа: 5-10% раствор хлорной извести, 4% раствор едкой щелочи, 5% раствор карболовой кислоты.

Факторы вирулентности

Патогенность. В естественных условиях к колибактериозу восприимчивы телята, поросята, ягнята, жеребята, цыплята, а также грудные дети.

Наиболее существенными факторами патогенности кишечных бактерий следует считать энтеротоксигенность, адгезивность, инвазивность.

Энтеротоксигенность - способность бактерий продуцировать энтеротоксины, которые повреждают кишечный эпителий, проникают в кровь и через неё в различные органы и ткани, обуславливая токсикоз.

Инвазивность - проникновение бактерий в кишечный эпителий с последующим их внутриэпителиальным размножением или прохождением через него без колонизации с последующим развитием генерализованного процесса (септицемии).

Адгезивность - образование антигенов адгезии, располагающихся на поверхности оболочки клетки в форме ресничек (получивших название фимбрий, пили), свойства которых изложены ниже.

В зависимости от факторов патогенности и механизма их патогенетического воздействия на макроорганизм, патогенные для животных и человека эшерихии могут быть разделены на две группы. Первую группу составляют инвазивные штаммы, вызывающие синдром диареи (энтероколиты). Во вторую группу входят неинвазивные формы, характеризующиеся двумя особенностями: 1) они размножаются и колонизируются в области тонкого кишечника и 2) производят один или более энтеротоксинов. У штаммов второй группы токсин, вызывающий развитие патологического процесса, не имеет прямого отношения, к первой стадии взаимодействия микробы с клетками эпителия кишечника. Эта стадия осуществляется адгезинами, расположенными на поверхности клетки. При колонизации слизистой оболочки эшерихий обнаруживаются по всей поверхности ворсинок эпителия от вершины до основания и даже на краевых щетинках, в то время как неэнтеротоксигенные штаммы, как правило, остаются в просвете кишечника. Наиболее изученными адгезинами, образуемыми эшерихиями и вызывающими заболевания у молодняка животных, являются K88, 987P, K99, F41. Адгезины K88 и 987P обнаружены у штаммов, вызывающих чаще диарею у

поросят, адгезии K99 - у штаммов, выделенных от телят, ягнят и поросят. Адгезии F41 свойственны штаммам, патогенным для телят. Адгезии K88 представляет собой фибриллы длиной 0,1-1 мкм и диаметром 2,1 нм.).

Кроме адгезинов, в адгезии энтеропатогенных *E. coli* с клетками тканей животных и человека участвуют электростатические связи и фактор гидрофобного взаимодействия.

Все энтеропатогенные штаммы, производящие какой-либо вид адгезинов, вырабатывают один или два вида энтеротоксина - термолабильного (ЛТ) и термостабильного (СТ). Наиболее чувствительной к действию энтеротоксина является передняя часть тонкого отдела кишечника, в которой энтеропатогенные эшерихий колонизируются на слизистой оболочке. Все энтеротоксины энтеробактерий по характеру их специфического действия на клеточные элементы кишечника организма хозяина разделили на цитотоксины и цитотоксины. Первые не изменяют клеточные структуры, вторые их разрушают. Наиболее часто диарея вызывается в результате воздействия термолабильного (ТЛ) энтеротоксина.

Патогенез. У каждого вида животного имеются определенные серологические группы возбудителей колибактериоза. Развитию колибактериоза способствует неполнозначное молозиво, бедное витаминами и специфическими антителами. Возбудитель проникает в организм новорожденных животных аэрофагально, перорально, алиментарно. Инкубационный период короткий от нескольких часов, но никогда не превышает 3 дней.

3. Лабораторная диагностика. Для прижизненной диагностики направляют кровь или фекальные пробы. Для посмертной диагностики в лабораторию направляют кусочки внутренних паренхиматозных органов: печени, селезенки, легкого, сердца, а также участок тонкого отдела кишечника, трубчатую кость. Схема лабораторной диагностики предусматривает 4 метода исследования: микроскопического, бактериологического, биологического и серологического.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевшего молодняка вырабатывается гуморальный (типоспецифический иммунитет), а также клеточный и местный иммунитет. Переболевший молодняк в течение 3-5 лет является бактерионосителем. Молодняк, родившийся от вакцинированных маток с первыми порциями молозива, получает колоstralный иммунитет. Для иммунизации используют: вакцину поливалентную гидроокисьальюминиевую формолтиомерсаловую против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят; вакцину поливалентную против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей. Для лечения: коли-протектан ВИЭВ; сыворотку поливалентную против колибактериоза сельскохозяйственных животных.

1.14 Лекция №14 (2 часа).

Тема: «Возбудители сальмонеллэза».

1.14.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств сальмонелл.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика сальмонеллеза.

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств сальмонелл.

Сальмонеллезы - группа инфекционных болезней преимущественно молодняка с.х. животных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом – воспалением легких. У взрослых

животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны abortionы. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Американские ветеринарные врачи Сальмон и Смит в 1885 г. выделили из органов свиней, павших от чумы, микроб, названный позже *Bad. suis*. В 1888 г. Гертнер при выяснении этиологии отравлений людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека. Он был назван *Bact. enteritidis*. В 1892 г. Леффлер выделил от павших мышей микроб, получивший название *Bact. typhimurium*. В честь Сальмона микроорганизм, выделенный им, был назван сальмонеллой, а пищевое отравление, вызываемое микробом, - сальмонеллезом.

В настоящее время известно более двух тысяч серовариантов сальмонелл, объединенных в один род - *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Классификация возбудителей

Сем. *Enterobacteriaceae* Род: *Salmonella* Виды сальмонелл, имеющих наибольшее значение в патологии животных:

- S. enteritidis* (dublin) - у телят.
- S. choleraesuis* (swine) - у поросят.
- S. typhimurium* - у свиней.
- S. typhimurium* - у водоплавающей птицы.
- S. abortus* egui -.abortus кобылы.
- S. abortus* ovis - у овец.
- S. pullorum* (S. gallinarum) - у птиц.

Морфология. Сальмонеллы - мелкие палочки с закругленными концами длиной 1-4 и шириной 0,3-0,8 мкм. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum*-*gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму окрашиваются отрицательно

Культуральные свойства. Сальмонеллы - аэробы и факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста 37 С, pH среды 7,0-7,2, однако могут расти и при pH ниже 7,0, до 8,0 и выше. Хорошо растут на обычных питательных средах МП А, МП Б, средах Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агаре и др. На МПА образуют небольшие, диаметром 1-2 мм, круглые колонии с ровными краями, серо-белого цвета с голубоватым оттенком. У некоторых видов сальмонелл по краю колонии заметен выпуклый слизистый вал. На среде Эндо колонии прозрачные, бледно-розового цвета, на среде Левина - прозрачные с голубоватым оттенком, на среде Плоскирева - бесцветные, слегка мутноватые, на висмут-сульфитном агаре - черного цвета с металлическим блеском. В МПБ - слабое помутнение, на дне пробирки осадок серо-белого цвета, на поверхности среды в старых культурах иногда тонкая пленка или пристеночное кольцо.

Биохимические свойства. Сальмонеллы не ферментируют сахарозу, не разлагают лактозу, адонит, не расщепляют салицин и мочевину, не образуют индола, образуют сероводород; реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, реакция с метиловым красным - положительная. Глюкозу ферментируют все виды (серовары) сальмонелл с образованием газа и кислоты или только кислоты без газа. Большинство сальмонелл ферментируют маннит. Биохимическая активность у сальмонелл различных сероваров варьирует.

Антигенная структура. Представлена соматическим, или О-антигеном и жгутиковым, или Н-антигеном. О-антиген расположен на поверхности микробной клетки и представляет собой термостабильный фосфолипидно-полисахаридный комплекс, не разрушающийся при кипячении в течение двух часов.

Н-антигены обладают как специфическими свойствами, характерными для определенного вида (антигены первой фазы), так и неспецифическими (антигены второй фазы). Если сальмонеллы содержат оба жгутиковых антигена, их называют двухфазными, если один - однофазными.

На основании общности соматических О-антител сальмонеллы объединены в серологические группы, которые обозначены прописными буквами латинского алфавита: А, В, С, Д и др. Всего установлено свыше 60 серологических групп. В лабораториях используют диагностическую схему Кауфмана-Уайта, построенную на анализе О- и Н-антител. В соответствии с особенностями антигенной структуры каждая группа объединяет большое количество сероваров, расположенных в алфавитном порядке по обозначению первой фазы их Н-антитела. При этом первая фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (а, б, с, д, е и т. д.), вторая фаза - арабскими цифрами или латинскими буквами (1, 2, 5, 6; е, д и т. д.).

Для определения серовара сальмонелл биофабрики выпускают поливалентные О-сыворотки, О-моносыворотки, а также монорецепторные Н-сыворотки, которые используют в реакции агглютинации на стекле, с живыми супочными культурами на плотной питательной среде.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика сальмонеллеза.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды. При 60°C погибают в течение 1 ч, при 100°C - моментально. В сухой почве сохраняются от 145 до 270 суток, в высушенном навозе от 1 до 1,5 лет, в трупах - до 100 суток, в открытых водоемах и питьевой воде - от 11 до 120 суток, в замороженном мясе - от 6 месяцев до 3 лет, в колбасных изделиях - от 60 до 130 суток, в скорлупе яиц - до 3 месяцев, в яичном порошке - до 9 месяцев, на замороженных овощах и фруктах - от 2 недель до 2,5 мес. Обычное копчение (в домашних условиях) не убивает сальмонелл. В соленом мясе сохраняются 4-8 мес. При воздействии прямых солнечных лучей погибают через 5-9 ч. Дезинфицирующие вещества (2%-й раствор фенола, 3%-й раствор гидроксида натрия, хлорсодержащие растворы с 5 % активного хлора, 3%-й раствор формальдегида) убивают сальмонелл в течение 15-20 мин. Сальмонеллы чувствительны к гентамицину, неомицину, тетрациклину, левомицетину, стрептомицину, менее чувствительны к сульфаниламидным и нитрофурановым препаратам.

Патогенность. Патогенные свойства сальмонелл обусловливают два вида токсинов: экзотоксин и эндотоксин. Экзотоксины - продукты жизнедеятельности, активно (при жизни) продуцируемые в окружающую среду. Эндотоксин образуется в результате лизиса клеток. Основной компонент эндотоксина - полисахарид. Молекула его состоит из двух компонентов: полисахарида и липида А, который определяет токсичность всей молекулы. Эндотоксины вызывают геморрагическое воспаление кишечника, кормовое отравление у свиней и плотоядных. Экзотоксины - яды исключительно высокой активности; избирательно поражают отдельные органы и ткани.

Патогенез. Основные пути заражения - алиментарный и аэробный, возможно внутриутробное и трансовариальное заражение у птиц. Сальмонеллы вначале размножаются в тонких кишках, затем через кишечные ворсинки проникают в лимфатическую систему, кровь, током крови разносятся в паренхиматозные органы, где размножаются. При гибели бактерий высвобождаются эндотоксины, вызывающие воспалительные, дистрофические, некробиотические и другие изменения в тканях органов и кровоизлияния в них, последние отмечаются и на серозных покровах и в слизистых оболочках кишечника и мочевого пузыря. Больные животные выделяют сальмонеллы в основном с фекалиями и мочой, птицы - с пометом, яйцами.

3. Лабораторная диагностика.

Бактериологическая прижизненная диагностика основана на исследовании крови в первые дни заболевания, истечений из родовых путей и фекалий. У птиц при жизни исследуют кровь со специфическим антигеном в пластинчатой РА.

Посмертно в лабораторию направляют свежий трупы мелких животных и птиц, от трупов крупных животных - паренхиматозные органы или части их (печень с желчным пузырем), селезенку, почку, мезентериальные лимфатические узлы, трубчатую кость, от телят - измененные участки легких; в случае аборта - свежий плод.

Полученный материал высевают в МПБ, на МПА и дифференциальные среды - Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агар, а при подозрении на хроническое течение болезни дополнительно на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера и др.).

Полученные на средах культуры дифференцируют и идентифицируют на основании морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств согласно существующим наставлениям.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет после переболевания гуморального и клеточного типа. Для лечения и профилактики используют: концентрированную формолквасцовую вакцину против паратифа (сальмонеллеза) телят готовят из селекционированного штамма *S. dublin*; вакцину против паратифа (сальмонеллеза) поросят готовят из трех штаммов в соотношении: *S. choleraesuis* — 50 %, *S. typhimurium* — 25 %, *S. dublin* — 25 %; формолтиомерсаловую вакцину против колибактериоза и паратифа пушных зверей, птиц, телят и поросят; сухую живую вакцину против паратифа свиней из штамма ТС-177; вакцину против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма *S. dublin* № 6; вакцину живую сухую против сальмонеллеза водоплавающей птицы; вакцину формолтиомерсаловую поливалентную против сальмонеллеза овец; поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа и колибактериоза телят, ягнят, овец и птиц.

1.15 Лекция №15 (2 часа).

Тема: «Возбудитель листериоза».

1.15.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя листериоза.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика листериоза.

1.15.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя листериоза.

Листериоз (Listeriosis) — инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся у животных поражением нервной системы, септическими явлениями,abortами и маститами. Летальность при листериозе 47%, а при нервных формах болезни — 98—100%.

Инкубационный период - 7-30 дней. Протекает остро, подостро, хронически. Отличается многообразием форм клинического проявления: нервная, септическая, генитальная, атипичная, бессимптомная.

При *нервной форме* повышается температура до 40-41 градусов по Цельсию, отмечается угнетение, потеря аппетита, слабость, светобоязнь, слезотечение, истечение слизи из ноздрей, «ходульная походка», атаксия. Периоды депрессии чередуются с периодами возбуждения (животные не обращают внимания на препятствия, неудержимо стремятся вперед или движутся по кругу), наблюдаются судороги, дрожь, гиперкенез жевательной мускулатуры, в конце болезни быстро прогрессируют парезы и параличи; ослабление или полная потеря зрения. Болезнь длится от нескольких часов до 10 дней и в 60-100% случаев заканчивается смертью. *Септическая форма* регистрируется у животных в первые месяцы жизни и сопровождается повышением температуры тела, угнетением,

снижением и потерей аппетита, поносами. Длится 7-14 дней, в большинстве случаев животные погибают. *Генитальная форма* проявляется.abortами во второй половине беременности, задержанием последа, эндометритами, маститами у коров. *Атипичная форма* встречается сравнительно редко, отмечается лихорадочное состояние, пневмонии и гастроэнтериты. У лошадей болезнь протекает в виде энцефалита. У птиц – септически (конъюнктивит, угнетение чередуется с возбуждением, судороги, парезы и параличи).

Возбудитель листериоза, *Listeria monocitogenes*, был выделен в 1892 г. Лусетом от больных кроликов. В 1927 г. Пири выделил возбудителя при септическом заболевании крысоподобных грызунов с типичным поражением печени и назвал его «листерелла», но в 1940 г. он переименовал его на «листерия». По современной классификации отнесены к роду *Listeria*, в котором насчитывается пять видов. Основной вид - *Listeria monocitogenes* – вызывает болезнь у животных многих видов и человека.

Морфология. *Listeria monocitogenes* – полиморфная палочка с закругленными концами, длиной 0,5...3 мкм и шириной 0,3...0,5 мкм; подвижная, грамположительная. В мазках палочки располагаются поодиночно или под углом в виде римской цифры V. Спор и капсул не образуют.

Культивирование. Листерии – факультативные аэробы. Оптимум температурного роста на питательных средах с pH 7,2-7,4 составляет 36-38°C, однако они могут расти при температуре от 4 до 45°C. На МПА образуют мелкие, круглые, выпуклые, прозрачные колонии диаметром от 0,2-0,4 до 2 мм. В МПБ вызывают помутнение среды с образованием слизистого осадка. Листерии хорошо растут на печеночных средах с добавлением 1 % глюкозы и 2-3 % глицерина. В качестве элективных сред используют МПБ с 0,05 % теллурита калия или 0,01-0,02 % теллурита калия в водном растворе глицерина и растворе флоримицина или полимиксина. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона гемолиза.

Биохимические свойства. Ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, рамнозу и салицин, замедленно сахарозу, крахмал и глицерин; некоторые культуры разлагают лактозу и мальтозу. Не ферментируют арабинозу, дульцит, инулин и сорбит, не образуют индола и сероводорода, не разжижают желатин, не восстанавливают нитраты в нитриты, дают положительную пробу на каталазу, обладают редуцирующими свойствами.

Антигенная структура. Листерии имеют два антигена: соматический (O) и жгутиковый (H). Различают две серологические группы, объединяющие различные в антигенном отношении листерии. Установлено 16 основных серологических групп, многие из которых подразделены на подгруппы. Наиболее часто выделяют 1-й и 4-й серотипы листерии.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Устойчивость. Листерии устойчивы во внешней среде. В почвах они сохраняют жизнеспособность от 6 до 11 мес и размножаются в почвенных экстрактах; в воде – в течение года и более, в навозе – до 7 месяцев, в силосе – более года, в мясе – до года. В бульонных культурах листерии погибают при 100°C через 10-15 мин, при 55°C – через 1 ч; 2,5%-й раствор формальдегида обезвреживает их через 20 мин, 2,5%-й раствор гидроксида натрия, раствор хлорной извести с содержанием 2%-го активного хлора – через 20 мин

Патогенность и патогенез. Листерии патогенны для многих видов млекопитающих, в том числе грызунов, хищных и копытных, а также для птиц. Из домашних животных листериоз зарегистрирован у овец, коз, свиней, крупного рогатого скота, лошадей, кроликов, кур, уток и др. Наиболее чувствительны белые мыши и кролики. Заражают внутрибрюшинно или внутривенно в дозе 0,30,5 мл суточной бульонной культуры.

В зависимости от места внедрения возбудитель распространяется в организме различными путями: гематогенным, лимфогенным и нейрогенным. Различают септическую и нервную формы болезни. При септической форме, которую чаще

наблюдают у молодняка, листерии заселяют все органы и ткани организма, вызывая дегенеративные изменения в паренхиматозных органах. Нервная форма проявляется менингоэнцефалитом, при этом листерии обнаруживают только в головном и спинном мозге. У беременных животных листерии вызывают гибель плодов и abortы. Патогенное действие листерии обусловливается за счет выделения экзо- и эндотоксинов.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика листериоза.

Лабораторная диагностика листериоза основана на результатах бактериологического исследования, в отдельных случаях применяют серологическую диагностику. Выделенные культуры исследуют на подвижность, изучают их ферментативные свойства на средах Гисса, ставят пробу на каталазу. Проводят дифференциацию от возбудителя рожи свиней. Ставят капельную РА на стекле с поливалентной листериозной агглютинирующющей сывороткой. Затем с помощью серогрупповых сывороток определяют серогруппу выделенной культуры. Специфические свойства листерии проверяют также с помощью конъюнктивальной пробы на морских свинках или внутрикожной пробы на морских свинках или кроликах. Для типирования культур используют также листериозные бактериофаги, включающие два монофага. *Серологическая диагностика.* Сыворотку животных исследуют в РА и РСК, ИФА.

Разработана ПЦР.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают иммунитет. С профилактической целью применяют сухую живую вакцину из штамма АУФ. После однократного ее введения у крупного рогатого скота, свиней и овец создается иммунитет.

1.16 Лекция №16 (2 часа).

Тема: «Возбудитель рожи свиней».

1.16.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя рожи свиней.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика

1.16.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя рожи свиней.

Рожа свиней - инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении септициемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом - эндокардитом и артритами. Болеют животные преимущественно в возрасте 3-12 мес.

Инкубационный период 2-5 дней, но может быть и более продолжительным. В зависимости от количества и вирулентности возбудителя, ворот инфекции, восприимчивости животных и факторов внешней среды рожа может протекать молниеносно, остро, подостро и хронически. Различают также септическую, кожную (крапивница) и латентную формы. **Молниеносное течение** регистрируют сравнительно редко, преимущественно у откармливаемых подсвинков в возрасте 7—10 мес. Острое течение наиболее типично для септической формы рожи. Болезнь начинается угнетением общего состояния и внезапным повышением температуры тела до 42°C и выше. Ослабление сердечной деятельности приводит к отеку легких, затрудненному дыханию и цианозу кожи в подчелюстной области, а также шеи и брюшной стенки. Эритематозные пятна бледно-розового, а в последующем темно-красного цвета различной величины и формы появляются на 1-2-й день после начала заболевания лишь у отдельных животных.

Заболевание продолжается 2-4 дня и без лечебной помощи часто заканчивается гибелью животного.

Подострое течение рожи проявляется сравнительно легче в кожной форме (крапивница), для которой свойственны повышение температуры до 41°C и выше, слабость, снижение аппетита и жажды. Для крапивницы характерным признаком служат образование через 1-2 дня на коже головы и туловища, реже на других участках тела, плотных воспаленных припухлостей квадратной, ромбической и реже округлой формы. Количество и размеры эритематозных пятен сильно варьируют между собой, захватывая обширные участки кожи. В большинстве случаев крапивница протекает доброкачественно, и при выздоровлении животного пятна постепенно бледнеют и исчезают.

Хроническое течение рожи в редких случаях представляет самостоятельное проявление болезни. Большой частью это лишь продолжение септической формы или крапивницы с осложнениями, проявляющимися разлитым (рожистым) некрозом кожи, верукоизным эндокардитом и хроническим поражением других органов.

Возбудитель рожи свиней - бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Бактерию открыли Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г.

Морфология. Возбудитель - тонкая прямая или слегка изогнутая мелкая палочка размером 0,2-0,3 x 1,5-2 мкм. В старых бульонных культурах и в наложениях на сердечных клапанах при верукоизном эндокардите обнаруживают удлиненные и нитевидные формы. Бактерии неподвижны. Споры и капсул не образуют. Грамположительные, хорошо окрашиваются обычными анилиновыми красителями.

Культивирование. Факультативный анаэроб. Растет в МПБ, на МПА, МПЖ, ПЖА (0,15-0,2% агара), бульоне Хоттингера, элективной среде Сент-Иваны (агаровая среда с 0,1 % кристаллиолета и 1 % азida натрия). Оптимальные условия для роста: температура 36-37°C, pH 7,2-7,6. В МПБ вызывает слабое помутнение без образования пристеночного кольца и пленки, при встряхивании пробирки хорошо заметны муаровые волны: через 48-72 ч среда несколько просветляется, на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании поднимается в виде облачка. На МПА растет в виде мелких росинчатых просвечивающихся колоний (S-форма), с трудом различимых невооруженным глазом: S-формы выделяют при септицемии. При хроническом течении болезни могут вырастать колонии R-формы крупные, с неровной шероховатой поверхностью и отходящими от края корнеобразными отростками. В столбике желатина при посеве уколом через 6-10 суток от серовато-белого стержня отходят горизонтальные нежные отростки, напоминающие по форме щетку; желатин не разжижается.

Биохимические свойства. Возбудитель выделяет сероводород, не образуют индол и каталазу; большинство штаммов разлагают с образованием кислоты без газа лактозу, глюкозу, галактозу, левулезу, редко - ксилозу, арабинозу, мальтозу и рамнозу, не ферментируют сахарозу, маннит и салицин.

Антигенная структура. По содержанию антигенов бактерии рожи свиней могут быть разделены на три группы: А, В и Н. Антиген Н - общий видовой. Серовары А и В отличаются своими гаптенами. Штаммы серовара В несут гемагглютинирующий и растворимый иммуногенный антиген, поэтому они особенно пригодны для активной иммунизации. От больных свиней, а также здоровых бактерионосителей выделяют преимущественно штаммы серовара А (до 95 %), реже серовара В и очень редко - Н.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Устойчивость. Возбудитель обладает высокой устойчивостью во внешней среде. В трупах животных может сохраняться, а иногда и размножаться в течение 3-4 месяцев. В почвах, богатых органическими веществами, сохраняется 7-8 месяцев, в навозной жиже - до 20 суток, в водопроводной воде - 108, в речной воде при 4°C - 75-86, в моче свиней - 135-145, в фекалиях - 38-75 суток. В засоленной свинине бактерии выживают до 6

месяцев, в копченых продуктах - до 3 месяцев. Прямые солнечные лучи убивают через 10-12 суток, высушивание при рассеянном свете - через 3-4 недели; нагревание при 50°C - через 15 мин, при 70°C - через 5 мин. Бактерия не устойчива к антибиотикам и дезинфицирующим средствам. Особенно эффективны 2-3% растворы гидроксида натрия, 20% взвесь свежегашеной извести, 2% раствор формальдегида, 5% горячий раствор кальцинированной соды.

Патогенность и патогенез. Восприимчивы к бактериям свиньи, особенно в возрасте от 3 месяцев до 1 года. Сporадические случаи болезни отмечены у лошадей, крупного рогатого скота, овец, оленей, собак. Восприимчивы дельфины, многие виды грызунов и насекомоядных, утки и гуси, а также куры и индейки. Бактерии рожи патогенны и для человека. Обнаружены на поверхности тела, в кишечнике и даже мышцах некоторых видов морских и пресноводных рыб, для которых они непатогенны.

К экспериментальному заражению восприимчивы белые мыши и голуби, они гибнут через 2-5 суток. Менее чувствительны кролики, которые после внутривенного заражения гибнут на 3-6-е сутки.

Заражение свиней и других видов животных, в том числе птиц, происходит при проникновении возбудителя алиментарно, через поврежденную кожу или при укусах кровососущих насекомых. Попадающие в организм бактерии не сразу проникают в кровь и внутренние органы, часто оседают в миндалинах и солитарных фолликулах кишечника. Размножаясь в месте первичной локализации, выделяют токсические вещества, обусловливающие сенсибилизацию организма. При неблагоприятном течении болезни наблюдается диссеминация возбудителя лимфогенным и гематогенным путями, развивается сепсис, накапливаются токсические продукты бактерий, происходят дистрофические и некробиотические изменения в тканях, подавляется фагоцитоз, наступают тяжелые функциональные расстройства сердечно-сосудистой системы и гибель животных. При подостром и хроническом течении болезни происходит локализация возбудителя и обезвреживание его токсических продуктов, активизируется синтез специфических иммуноглобулинов и фагоцитоз, преобладают аллергические реакции, проявляющиеся в виде кожной экзантемы, верукоизного эндокардита и серозно-фибринозных артритов. Возможна персистенция возбудителя рожи свиней в организме животных.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика рожи свиней.

Выявление возбудителя рожи проводят с использованием микроскопического, бактериологического и серологического (РА, РИФ) методов. РА ставят с гипериммунной лечебной сывороткой. На предметное стекло наносят каплю сыворотки в разведении 1:50, затем петлей вносят суточную агаровую культуру и тщательно растирают ее. В положительном случае агглютинация наступает быстро, агглютинат имеет вид плотных мелких комочеков.

Биологическая проба. Белых мышей или голубей заражают суспензией (1:10) из органов или бульонной культурой; мышей заражают подкожно (0,1-0,2 мл), голубей - внутримышечно (0,2-0,3 мл). Мыши и голуби погибают через 2-4 суток. Из органов павших делают посев в МПБ и на МПА для выделения чистой культуры возбудителя.

Бактерию рожи свиней необходимо дифференцировать от возбудителя листериоза.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие свиньи приобретают стойкий и длительный иммунитет. Поствакцинальный активный иммунитет продолжается в среднем 4-6 месяцев, пассивный - до 2 недель. Для профилактики применяют живую вакцину жидкую и лиофилизированную против рожи свиней из штамма ВР-2. Для пассивной профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Положительный эффект при лечении оказывают антибиотики (пенициллин, стрептомицин, окситетрациклин, эритромицин и др.), особенно в сочетании с гипериммунной сывороткой.

1.17 Лекция №17 (2 часа).

Тема: «Возбудители туберкулёза».

1.17.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя туберкулёза.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика туберкулёза.

1.17.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя туберкулёза.

По оценкам экспертов ВОЗ, треть населения земли инфицирована туберкулёзом. Из 17 доклада ВОЗ, озвученного в преддверии дня борьбы с туберкулёзом (24 марта), в 2011 году у 8,7 миллиона человек развился туберкулез, а 1,4 миллиона человек умерли от этой болезни. Это делает ее второй по значимости, уступающей лишь СПИДу, причиной смерти от какого-либо отдельного возбудителя инфекции в мире. В Оренбургской области заболеваемость свыше 100 человек на 100 тысяч, т.е. у нас эпидемия туберкулёза (по данным ВОЗ 50 на 100 тысяч). В Домбаровском районе до 200 на 100 тыс., а в тюрьмах до 5 тыс. на 100 тыс. Всё началось в 90-е годы. Неслучайно есть фраза «Мерило несовершенства социальных преобразований – инфекционные заболевания».

Туберкулез – это инфекционное, хронически протекающее заболевание у человека, животных, птиц, характеризуется образованием множественных туберкулов (буторков), подвергаемых творожистому перерождению, обызвествлению.

Туберкулез обычно протекает хронически, и нередко без ярко видимых признаков. Большинство больных туберкулезом животных по внешнему виду и общему состоянию, особенно в начале болезни, ничем не отличаются от здоровых. Больных животных выявляют в основном аллергическим и серологическим исследованием, туберкулезные поражения обнаруживают обычно лишь при посмертном осмотре органов.

По месту локализации патологического процесса различают легочную и кишечную формы туберкулеза; встречаются также поражения вымени и серозных покровов (жемчужница), генитальная форма и генерализованный туберкулез.

Условно принято различать открытый (активный) туберкулез, когда возбудитель болезни выделяется во внешнюю среду с молоком, фекалиями, мокротой при кашле, и закрытый (латентный) при наличии инкапсулированных очагов без выделения возбудителя во внешнюю среду. При поражении кишечника, молочной железы, матки процесс всегда считают открытым.

У крупного рогатого скота при туберкулезе чаще поражаются легкие. При сильном поражении их наблюдают незначительное повышение температуры тела, редкий, но сильный кашель; при затяжном течении болезни кашель становится слабым, беззвучным, но мучительным. Поражение молочной железы характеризуется увеличением надвыменных лимфоузлов, которые становятся плотными, бугристыми, малоподвижными. В пораженных долях вымени прощупываются уплотненные безболезненные фокусы, при значительном поражении изменяется конфигурация пораженной доли.

Туберкулез свиней протекает бессимптомно. Иногда наблюдают увеличение подчелюстных и заглоточных лимфоузлов.

Овцы и козы туберкулезом болеют редко и бессимптомно. При сильно выраженным процессе клинические признаки сходны с таковыми крупного рогатого скота.

Туберкулез у птиц протекает хронически, с неясными клиническими признаками. Генерализованная форма сопровождается вялостью, снижением яйценоскости, истощением (атрофия грудных мышц). При поражении кишечника наблюдают поносы; печени — желтушное окрашивание слизистых оболочек и кожного покрова. Иногда отмечается хромота, образование опухолеподобных образований на подошвенной поверхности конечностей.

Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г., за что в 1911 г. был удостоен Нобелевской премии. Птичий вид открыли Штраус и Гамалея (1891). В настоящее время все возбудители туберкулеза и атипичные микобактерии (всего известно 74 вида) относятся к роду *Mycobacterium*. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (Мус. tuberculosis), животных (Мус. bovis), птиц (Мус. avium). Морфологически все виды микобактерий туберкулеза сходны между собой и культивируются на одних и тех же питательных средах. В мазках из мокроты или органов микобактерии — небольшие тонкие палочки размером 1,5—4x0,4 мкм, грамположительны. На искусственных питательных средах могут образовывать ветвящиеся формы. Микобактерии туберкулеза обладают большой полиморфностью: встречаются палочковидные, зернистые, нитевидные, кокковые, фильтрующиеся и L-формы. Микобактерии туберкулеза неподвижны, спор не образуют, жгутиков не имеют. Они кислото-, спирто- и щелочеустойчивы из-за высокого содержания липидов (от 30,6 до 38,9 %) и вследствие этого трудно окрашиваются анилиновыми красителями, с трудом окрашиваются положительно по Граму и приобретают сине-фиолетовый цвет, но хорошо окрашиваются по Цилю-Нильсену в красный цвет. Для быстрого обнаружения микобактерии в различных объектах существует люминесцентный метод, в основе которого лежит их способность окрашиваться люминесцентными красителями (родамин-аурамином) и давать золотисто-желтый цвет под воздействием ультрафиолетового излучения. Метод обладает высокой чувствительностью, дает цветное изображение возбудителя.

Культивирование. Необходимым условием для осуществления биохимических процессов у микобактерий является создание оптимальной температуры: 37-38°C для человеческого, 38-39°C для бычьего и 39-41°C для птичьего вида. Микобактерии туберкулеза размножаются в строго аэробных условиях на специальных элективных питательных средах, содержащие соединения углерода, азота, водорода и кислорода, а также магний, калий, серу и фосфор. Стимулирующее влияние на рост туберкулезных микобактерий оказывают соли железа. Микобактериям туберкулеза присущ медленный обмен веществ: рост культур проявляется через 15-30 суток и более, в начале в виде почти незаметных микроколоний, из которых затем формируются визуально наблюдаемые макроколонии. В 1887 г. Нокар и Ру обнаружили у микобактерий туберкулеза глицерофильность. Глицерин оказался лучшим источником углерода, который добавляется теперь в различные среды. Для первичного выделения культур оправдали себя только плотные яичные среды Петраньяни, Гельберга и др. Для изучения биохимических свойств микобактерий и других целей целесообразно применять безбелковые синтетические среды Сотона, Моделя, для пересева и сохранения культур лучше использовать простые глицеринсодержащие среды (МПГБ, глицериновые картофель). На плотных средах микобактерии образуют сливающиеся бугристые колонии, которые могут иметь гладкую блестящую или шероховатую поверхность, а также сплошной морщинистый налет белого, или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета, при росте в жидких питательных средах образуют как поверхностный, так и придонный рост с наличием бугристой, морщинистой пленки крошкообразной консистенции, имеющей желтовато-коричневый, кремовый или бурый цвет.

Биохимические свойства. Микобактерии туберкулеза содержат различные ферменты. Ферменты эстераза и липаза расщепляют жиры; дегидраза - органические кислоты, в том числе аминокислоты; уреаза - мочевину, перигалоза - углеводы, каталаза - переоксид

водорода; протеолитические ферменты (протеаза) - белок. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углеводы, лецитин, фосфатиды. У молодых культур микобактерий туберкулеза сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

Факторы патогенности и токсикообразование. Микобактерии туберкулеза содержат эндотоксины - туберкулины (Р. Кох, 1890), которые проявляют токсическое действие только в больном организме. Вирулентные микобактерии содержат корд-фактор, повышающий их вирулентность, кроме того, корд-фактор разрушает митохондрии клеток зараженного макроорганизма, нарушая процессы дыхания и фосфорилирования. АЛА способствует длительному персистированию в организме.

Антигенная структура. Все без исключения микобактерии содержат полисахаридо-белково-липоидный комплекс, названный полным антигеном. При парентеральном введении у животных наблюдают образование антител, которые выявляют в серологических реакциях - РА, РП, РСК и др. Туберкулины также относятся к антигенам. В отдельности ни одна из фракций микобактерий туберкулеза (туберкулопротеиды, туберкулолипиды, туберкулополисахариды) не вызывает иммунологических сдвигов в организме. Образование антител вызывает лишь полисахаридо-липоидный комплекс, т. е. полный антиген.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Устойчивость. Микобактерии туберкулеза отличаются устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли Микобактерии сохраняют жизнеспособность от 2 до 7 месяцев и более; в проточной воде - более года, в почве - до 3 лет. Низкие температуры не влияют на жизнеспособность микобактерий. Микобактерии чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, в жаркие дни в мокроте они погибают через 1,5-2 ч. Особенно губительно для них ультрафиолетовое излучение. Важное значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде они погибают при 60°C в течение 1 ч, при 65°C - через 15 мин, при 70-80°C - через 5-10 мин. В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9-10 суток, а в скиншем молоке гибнет под воздействием молочной кислоты; в масле - недели, а в некоторых сырах - даже месяцы. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими неспорообразующими бактериями значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим веществам; 5% раствор фенола и 10%-раствор лизола разрушают возбудителя через 24 ч, 4% формалин - после 3 ч. В качестве дезинфицирующих растворов при туберкулезе наиболее эффективны: 3% щелочной раствор формальдегида при 3-часовой экспозиции; 2% (по формальдегиду) раствор метафора, растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция и взвеси, содержащие не менее 5 % активного хлора при экспозиции 3 ч; 1% раствор глутарового альдегида, 8% эмульсия феноцмолина из расчета 1 л/м² и при экспозиции 3 ч и др.

Патогенность. Бычий вид микобактерии вызывает болезнь у коров, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, оленей, маралов и др. Из лабораторных животных наиболее чувствительны кролики и морские свинки, у которых развивается генерализованный туберкулез.

Птичий вид микобактерии вызывает туберкулез у кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов, голубей, уток и др. В естественных условиях возможно заражение домашних животных (лошади, свиньи, козы, овцы, иногда крупный рогатый скот) и даже человека. Из лабораторных животных наиболее подвержены кролики, морские свинки менее восприимчивы.

Люди могут заражаться пищевым путем при употреблении термически не обработанных мясомолочных продуктов, что особенно характерно для заболеваний, вызванных *M. bovis*. Чаще поражаются дети.

Патогенез. Возбудитель туберкулеза, попав в организм аэрогенным, алиментарным и другими путями, проникает в межклеточные щели слизистой оболочки, где их поглощают подвижные полиморфноядерные лейкоциты (фагоциты) и с током лимфы или крови разносят по всему организму. Размножение микобактерии туберкулеза и взаимодействие с ними макрофагов происходит преимущественно в тканях с избирательной локализацией туберкулезного процесса (лимфатические узлы, легкие, печень и др.). В дальнейшем в местах жизнедеятельности возбудителя формируется защитный очаг - туберкул. Туберкулезные изменения в тканях представляют собой воспалительную реакцию, включающую в себя процессы альтерации (некроз части тканевых элементов), экссудации (выход из сосудов плазмы с форменными элементами) и пролиферации (формирование соединительной капсулы). Основу туберкула составляют фагоциты. Туберкул вначале имеет сероватый цвет и округлую форму; величина его от булавочной головки до чечевичного зерна. Затем узелок окружается соединительнотканной капсулой. Ткань внутри инкапсулированного узелка из-за отсутствия притока питательных веществ и под воздействием токсинов возбудителя отмирает и превращается в сухую крошковатую массу, напоминающую творог (казеоз). При высокой естественной резистентности организма и минимальных дозах возбудителя может произойти заживление первичного туберкулезного комплекса с одновременным разрушением содержащихся в нем микобактерий. Но чаще всего инкапсулированные первичные очаги обнаруживаются и вместе с находящимися внутри них туберкулезными микобактериями сохраняются в организме длительное время, даже в течение всей жизни. В организме с пониженной резистентностью процесс инкапсуляции возбудителя в первичном очаге выражен слабо. Вследствие недостаточной регенерации соединительной ткани происходит расплавление стенок туберкулезного узелка, при этом микобактерии попадают в здоровую ткань, что приводит к образованию множества мелких узелков, которые могут сливаться между собой, образуя крупные туберкулезные фокусы. Микобактерии из туберкулезных фокусов могут попасть в кровь, что приводит к генерализации процесса и развитию в разных органах туберкулезных очагов различной величины. При такой стадии болезни отмечается неблагоприятный исход туберкулезной инфекции - истощение и смерть.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика туберкулёза.

Лабораторная диагностика туберкулеза включает микроскопический, микробиологический, биологический и серологический методы.

В качестве патматериала используют: пораженные органы и ткани, кровь, экссудат, транссудат, гной, молоко, масло, творог, мочу, фекалии, навоз, почву, воду, соскобы с различных объектов животноводческих помещений и др.

В каждом случае перед посевом применяют соответствующий метод обработки материала: обрабатывают 6-10% раствором серной кислоты не более 25-30 мин; флотации.

Микроскопический метод. Наиболее распространенный метод. Он прост, доступен, позволяет быстро получить ответ, используя световую и люминесцентную микроскопию.

Бычий вид - микобактерии достигают длины 1,5-3,5 и толщины 0,3-0,5 мкм; также встречаются в виде оvoidных и кокковидных форм. Палочковидные формы чаще прямые и изогнутые, с округленными концами и зернистостью. Человеческий вид микобактерии - более длинные, тонкие и стройные. Микобактерии птичьего вида наблюдаются в виде коротких и длинных полиморфных палочковидных форм.

Культуральный метод. Вирулентные культуры микобактерии бычьего вида на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. Свежевыделенные культуры микобактерии птичьего вида растут быстрее, чем человеческого и бычьего. Рост характеризуется образованием гладких, мелких, круглых, белых, блестящих, с ровными краями колоний,

располагающихся как единично, так и в виде скоплений или сплошного слизистого налета.

Биологический метод. Сущность биологического метода дифференциации заключается в определении патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые отличаются восприимчивостью к различным микобактериям туберкулеза.

Биохимический метод. Основан на проявлении различной ферментативной активности микобактерии разных видов. Наиболее демонстративны следующие тесты биохимической дифференциации микобактерии: ниациновый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, деградация (разрушение) салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5% хлориду натрия и пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Серодиагностика. Для ранней диагностики туберкулеза, а также для определения антигенного родства между истинными и атипичными микобактериями используют реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Аллергическая диагностика туберкулеза. Занимает ведущее место в прижизненной диагностике туберкулеза у животных и птиц. Предполагает использование туберкулина (Р. Кох, 1890). Однако еще до Коха в России Гельман (1888-1889) изготовил экстракт из туберкулезных бактерий и испытал его с диагностической целью на больных туберкулезом коровах, получив положительный результат. Диагностика с помощью туберкулина наиболее распространена в медицине и ветеринарии. В настоящее время основным прижизненным методом исследования животных на туберкулез служит внутрикожная туберкулиновая проба. Туберкулин для млекопитающих изготавливают из штаммов только бычьего вида. Для внутрикожной пробы применяют сухой очищенный туберкулин (протеин пурифиед дериват - ППД). ППД был предложен М. А. Линниковой для медицинской практики. В ветеринарии используют стандартизованный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих, который содержит в диагностической дозе $10\ 000 \pm 2000$ туберкулиновых единиц (ТЕ), т. е. 0,2 мг препарата, растворенного в 0,2 мл растворителя. Сухой очищенный туберкулин (ППД) для птиц готовят по той же технологии, что и ППД для млекопитающих - из культурального фильтрата микобактерий туберкулеза птичьего вида и применяют для диагностики у птиц и свиней.

Иммунитет и средства специфической профилактики.

При туберкулезе иммунитет нестерильный, продолжается до тех пор, пока в организме присутствуют живые микобактерии туберкулеза. Роль живых бактерий туберкулеза в образовании иммунитета выявил Р. Кох в опыте повторного заражения больных туберкулезом морских свинок. Механизм формирования иммунитета при туберкулезе до конца не выяснен. Присутствующие в крови больных антитела (агглютинины, комплементсвязывающие и др.) играют ничтожную роль в защите макроорганизма. Значительную защитную функцию организма осуществляют Т-лимфоциты, тканевые элементы, образующие специфические бугорки (эпителиоидные, гигантские и лимфоидные клетки). Бугорок может инкапсулироваться и обызвествляться, что приводит к разрушению содержащихся в бугорке микобактерий. И. И. Мечников первый указал на роль макрофагов в разрушении возбудителя туберкулеза. Однако фагоцитоз имеет незавершенный характер и фагоцитированные микобактерии не погибают, а даже сохраняются в макрофагах.

Вакцину против туберкулеза предложили в 1924 г. французские ученые Кальметт и Герен. В течение 13 лет они культивировали штамм бычьих туберкулезных палочек на картофеле, пропитанном бычьей желчью с 5 % глицерина. В результате 230 пересевов культуры, непрерывно подвергавшейся воздействию желчи, авторы получили стойкий

вариант с определенными биологическими свойствами. Штамм этот назван культурой ВСО, по-русски БЦЖ. Кальметт и Герен предложили использовать культуру БЦЖ как безопасную вакцину для иммунизации людей и животных, в первую очередь крупного рогатого скота. В России противотуберкулезные прививки являются одним из важнейших мероприятий в профилактике туберкулеза человека. В ветеринарной практике вакцина БЦЖ не нашла применения

1.18 Лекция №18 (2 часа).

Тема: «Возбудители бруцеллёза».

1.18.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя бруцеллёза.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика бруцеллёза.

1.18.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя бруцеллёза.

Бруцеллез – это хроническая инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, человека, проявляющаясяabortами, эндометритами, расстройствами воспроизводительной функции, бурситами, артритами, рождением нежизнеспособного молодняка и рядом других признаков.

Инкубационный период при данной болезни длится от 2 до 4 недель. При отсутствии среди восприимчивого поголовья беременных животных, заболевание протекает бессимптомно (латентная форма). Диагносцировать болезнь у таких животных можно лишь с помощью серологического или аллергического методов исследования. У беременных животных всех видов бруцеллез характеризуетсяabortами во второй половине беременности. Коровы abortируют чаще на 5 — 8 месяце, овцы и козы — на 3 — 5 месяце беременности. Свиноматки могут abortировать как в первой, так и во второй половине супоросности, собаки — на 40 — 50-й день. У крупного рогатого скота и овец повторные abortы наблюдают редко. Abortы, как правило, сопровождаются задержанием последа и развитием слизисто-гнойного, а позже гноино-фибринозного эндометрита. Поражение половых путей влечет за собой нарушение воспроизводительной функции, что приводит к яловости, а порой и бесплодию. У отдельных особей бруцеллез может сопровождаться серозными бурситами, гигромами, артритами, тендовагинитами, и у мужских особей — орхитами и эпидидимитами со значительным увеличением семенников и опуханием мошонки. У свиней бруцеллез, кроме того, характеризуется появлением абсцессов в подкожной клетчатке в паренхиматозных органах, параличами мышц таза и конечностей, у лошадей — бурситами в области затылка и холки. У собак и кошек заболевание протекает бессимптомно и выявляется только серологическим методом. Птицы устойчивы к бруцеллезу даже при экспериментальном заражении.

Симптомы бруцеллеза у людей описал Гиппократ. Болезнь детально изучена в XVIII—XIX веках. Ф. Марстон (1861) описал бруцеллез как самостоятельное заболевание людей на острове Мальта.

Бруцеллы – возбудители бруцеллёзов человека и животных включены в род *Brucella*. Впервые возбудителя этого заболевания обнаружил Д. Брюс в 1886 г. в селезёнке умершего человека, а в 1887 г. выделил в чистой культуре. Данный вид бруцелл получил наименование *Brucella melitensis* (возбудитель мальтийской лихорадки). Другой вид возбудителя - *Brucella abortus* выделил Б. Банг и Б. Стрибольт из околоплодной жидкости при aborte коровы. Третий вид бруцелл - *Brucella suis* в 1914 г. Ж. Траум выделил от

свиней. В. 1953 г. Бадл, изучая заболевание инфекционного эпидидимита баранов, выделил *B. ovis*. В 1957 г. Стоеннерг и Лакман из трупов древесных крыс выделили микроорганизмы, идентичные бруцеллам, назвали их *B. neotomae*. В 1966 г. К. Майкл выделил возбудитель бруцеллоза собак – *B. canis*.

В настоящее время род *Brucella* включает в себя шесть видов: *B. abortus* – возбудитель бруцеллоза крупного рогатого скота; *B. melitensis* – возбудитель бруцеллеза овец и коз; *B. suis* – свиней; *B. canis* – собак; *B. neotomae* – кустарниковых крыс; *B. ovis* – инфекционного эпидидимита баранов. По антигенным и биохимическим свойствам подразделяют *B. abortus* на девять биоваров, *B. melitensis*-на три и *B. suis*- на пять биоваров. Наибольшее значение в патологии бруцеллоза имеют бруцеллы первых трёх видов и первых биоваров.

Морфология. Бруцеллы – мелкие грамотрицательные кокковидные или палочковидные бактерии, размером 0.6-1.5 x 0.5-0.7 мкм. Жгутиков не имеют. Спор не образуют. Свежевыделенные штаммы могут образовывать нежную капсулу.

Культуральные свойства. Бруцеллы строгие аэробы. *B. abortus* и *B. ovis* в первых генерациях нуждается в повышенной концентрации (5-10%) СО₂. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при 36-38°C и pH 6,8-7,2, однако для их культивирования используют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (МППБ), мясопептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГТА), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГГБ, ПГГА) с 1 % глюкозы и 23 % глицерина, картофельный агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Выделяемые из первичного материала бруцеллы растут очень медленно, в среднем 15-30 суток, старые лабораторные культуры вырастают уже через 24-48 ч. Вирулентные типичные штаммы (S-форма) на поверхности агара образуют мелкие, 2-3 мм в диаметре, круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью и ровными краями, прозрачные с голубоватым оттенком колонии; в бульоне – слабое равномерное помутнение и пристеночное кольцо, в дальнейшем – небольшой осадок. Авирулентные варианты (R-форма) на агаре образуют шероховатые колонии, в бульоне – неравномерное помутнение с просветлением и крошковатым осадком. На агаре с кровью бруцеллы гемолиза не дают, пигмент не синтезируют.

В жидких средах возникает равномерное помутнение. Под влиянием антибиотиков образуют L-формы.

Биохимическая активность бруцелл. Биохимическая активность у бруцелл выражена слабо. Не изменяют сахара короткого пёстрого ряда. Они утилизируют углеводы, но не образуют кислоту и газ в количествах, достаточных для их идентификации. Нитраты редуцируют в нитриты. Молоко не свёртывают, желатин и свёрнутую сыворотку не разжижают. Индол не образует. Некоторые виды гидролизуют аминокислоты с образованием аммиака. Ферментируют глюкозу, арабинозу, декстрозу, левулезу и др. с образованием кислоты. *B. abortus* и особенно *B. suis* при росте выделяют сероводород; *B. melitensis* образует его в незначительном количестве на средах серосодержащими аминокислотами. Могут продуцировать каталазу, пероксидазу, липазу, фосфотазу.

Антигенный состав. Бруцеллы содержат поверхностно расположенный Vi-антиген и соматические видоспецифические антигены А и М, количественное соотношение которых различно у разных видов. У *B. melitensis* преобладают М-антигены, у *B. abortus* и *B. suis* – А-антиген. Для идентификации бруцелл по антигенным свойствам используют реакцию агглютинации с монорецепторными сыворотками.

В организме бруцеллы выделяют эндотоксины.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Устойчивость в о внешней среде. Бруцеллы характеризуются большой устойчивостью к действию факторов окружающей среды. Они длительно сохраняют жизнеспособность при низкой температуре. В почве, моче, испражнениях животных, больных бруцеллозом, в навозе, сенной трухе возбудители выживают 4-5 мес., в шерсти

овец – 3-4 мес., в пыли – 1 мес. Длительно сохраняются в молоке и молочных продуктах, приготовленных без дополнительной термической обработки (в брынзе, масле остаются жизнеспособными в течение 4 мес.), в замороженном мясе – до 5 мес. К высокой температуре и дезинфицирующим веществам бруцеллы высокочувствительны: при 60°C погибают за 30 мин., при кипячении – мгновенно. Все дезинфектанты губят бруцеллы в течение нескольких минут.

Патогенность бруцелл. К бруцеллезу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, олени, маралы, яки, буйволы, лошади, верблюды, собаки, кошки, зайцы, сайгаки, лисицы, грызуны, дикие кабаны. У крупного рогатого скота, яков, буйволов, верблюдов, лошадей бруцеллез вызывают *Br. abortus*; у свиней, северных оленей — *Br. suis*; у коз, овец, буйволов — *Br. melitensis*; у собак — *Br. canis* (возможно и *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. abortus*). Определенное эпизоотологическое значение имеет возможность миграции различных видов бруцелл от одних животных к другим. Доказана миграция *Br. melitensis* от коз и овец на коров и свиней. *Br. suis* — от свиней на коз и овец.

Входными воротами инфекции чаще всего являются – слизистые оболочки и кожа. Животные заражаются от животных при общем водопое (водный путь), на пастбище (алиментарный путь), может передаваться и половым путём. Выраженные инвазивные и агрессивные свойства бруцелл обусловливают способность возбудителя проникать в организм через неповреждённые слизистые оболочки. Факторы вирулентности: 1) внутриклеточная локализация, что обуславливает длительное существование в организме; 2) способность возбудителя размножаться в клетках лимфоидно-макрофагальной системы; 3) наличие капсулы (блокирование фагоцитоза); 4) продуцирование эндотоксина, выделяющийся при разрушении микроорганизмов; 5) ферменты патогенности (гиалуронидаза и др.), способствующие распространению микробов в тканях.

Патогенез бруцеллёза. Возбудитель проникает в лимфоузлы и там размножается, локализуясь внутриклеточно. В лимфатических узлах создаётся резервуар возбудителя, устойчивый к действию защитных факторов (фагоцитозу), в результате – длительное сохранение. Генерализация: распространение лимфогенным и гематогенным путём по организму, поражение других лимфоузлов и других органов и тканей (селезёнка, костный мозг). Позже болезнь переходит в хрониосепсис – периодическое поступление микроорганизмов в кровь из лимфоузлов, содержащих их резервуар, далее – разрушение микроорганизмов, выделение эндотоксина. С первых дней болезни возникает реакция ГЗТ, которая сохраняется в течение всей болезни и длительное время после выздоровления. В поражённых тканях формируются гранулёмы (первые – к 20 дням от начала болезни). Больные животные выделяют возбудителя с мочой, фекалиями, молоком, abortированым плодом, околоплодной жидкостью, влагалищной слизью. У животных выражено нарушение вынашивания плода, возбудитель содержится в плаценте, в околоплодных водах, т.к. в плаценте имеется белок эритритол, который является хорошим субстратом для роста бруцелл.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика бруцеллёза.

Используются бактериологический, серологический, биологический методы.

Материалом для бактериологического исследования служат: abortированный плод; плодные оболочки; околоплодная жидкость; кровь; молоко; выделения из влагалища; сперма; половые органы; селезенка; костный мозг и др. Диагностика заключается в микроскопии мазков, получении чистых культур возбудителя и, при необходимости, проведения биологической пробы на морских свинках. Мазки-отпечатки из патологического материала окрашивают по Граму и специальными методами (по Козловскому, Стампу, модифицированному методу Циль-Нильсена), позволяющими дифференцировать бруцелл. Выделение чистой культуры при посеве патматериала на

специальной питательной среде является убедительным подтверждением диагноза. Неотъемлемой частью диагностики является биопроба на морских свинках.

Серологические исследования. Для проведения массовых профилактических обследований широко используют РА, РСК, ДСК, пластинчатую РА с роз-бенгал-антителом, кольцевую реакцию (КР) с молоком коров. Наличие среди обследуемого скота животных, реагирующих по РА в разведениях 1: 50 (для мелких), 1:100 (для крупных) и 1:10 для пушных зверей и морских свинок более чем в два креста, указывает на заболевание животных бруцеллезом, обнаружение антител в более низких титрах оценивается как сомнительный результат.

Аллергические исследования имеют наибольшую диагностическую ценность при поздних стадиях развития болезни. Для аллергических исследований применяют бруцеллин ВИЭВ. Препарат вводят под кожу нижнего века овцам и оленям в дозе 0,5 мл, крупному рогатому скоту и буйволам — в дозе 1 мл. Воспаление на месте введения аллергена расценивается как положительная реакция, животные признаются больными и подлежат убою.

Иммунитет. В основе иммунитета при бруцеллозе лежит клеточный иммунитет. Важную роль играет фагоцитоз и состояние аллергии. Обезвреживание бруцелл происходит при участии антител — опсонинов, агглютининов (хотя этот механизм не очень значим). Иммунитет носит нестерильный характер, т.е. его защитная функция слабо выражена и возбудитель сохраняется в организме.

Профилактика. Предупреждение возникновения бруцеллоза обеспечивается проведением комплекса общих и специфических мероприятий ветеринарной службой. Вакцинацию проводят живой ослабленной бруцеллезнной вакциной (для крупного рогатого скота — из штамма 82 Br.abortus, для мелкого рогатого скота — из штамма Рев-1 Br. melitensis), которую вводят животным планово.

1.19 Лекция №19 (2 часа).

Тема: «Возбудитель сибирской язвы».

1.19.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя сибирской язвы.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика сибирской язвы.

1.19.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя сибирской язвы.

Сибирская язва — острое инфекционное заболевание многих видов сельскохозяйственных и диких животных, а также человека, характеризуется признаками септицемии или образованием карбункулов, у свиней часто протекает с поражением заглоточных лимфатических узлов.

Сибирская язва известна еще с глубокой древности. Эпизоотии и эпидемии сибирской язвы в Средние века наносили огромные опустошения, вызывая гибель животных, заболевание и смерть людей во многих странах Европы. С.С. Андриевский, штабной лекарь, участвуя в экспедиции на Урале в 1786—1789 гг. установил, что сибирская язва у животных тождественна заболеванию у человека, доказал заразность болезни, заразив себя материалом, взятым от больного животного, и дал ей название «сибирская язва». Приоритет открытия возбудителя сибирской язвы принадлежит Ф. Полендеру (1849) в Германии, П. Райе и К. Давену (1850) во Франции. В 1876 Г.Р. Кох выделил культуру возбудителя и выявил феномен спорообразования. В 1881 г. Л. Пастер провел первые успешные опыты вакцинации животных ослабленными культурами. Через

два года в России Л.С. Ценковский изготавливал 1-ю и 2-ю вакцины против сибирской язвы, которые применяли в нашей стране в течение 80 лет. В дореволюционной России сибирская язва была одной из распространенных и опасных инфекционных болезней.

Клинические признаки болезни зависят от вирулентности возбудителя, степени устойчивости животного, пути его заражения. Инкубационный период длится 1...3 дня. Различают две основные формы болезни: септическую и карбункулезную. По локализации патологических изменений выделяют кожную, кишечную, легочную и ангинозную формы сибирской язвы. Кроме того, различают молниеносное, острое, подострое, хроническое и abortивное течение болезни. Исход заболевания, если не подвергать животных лечению, как правило, летальный.

При *молниеносном течении* (чаще регистрируется у овец и коз, реже — у крупного рогатого скота и лошадей) отмечают возбуждение, повышение температуры тела, учащение пульса и дыхания, синюшность видимых слизистых оболочек. Животное внезапно падает и в судорогах погибает. Длительность болезни от нескольких минут до нескольких часов. Температурная реакция в большинстве случаев остается незамеченной. *Острое течение* (характерно для крупного рогатого скота и лошадей) характеризуется повышением температуры тела до 42 °С, угнетением, отказом от корма, прекращением или резким сокращением лактации у коров, дрожью, нарушением сердечной деятельности, синюшностью видимых слизистых оболочек, часто с точечными кровоизлияниями. У лошадей нередко случаются приступы колик. Иногда отмечают запор или кровавую диарею. Кровь обнаруживают и в моче. Могут возникнуть отеки в области глотки и гортани, шеи, подгрудка, живота. Животные погибают на 2...3-й день болезни. В период агонии из носовых отверстий и рта выделяется кровянистая пенистая жидкость.

Подострое течение отмечают чаще у лошадей. Клинические признаки такие же, как и при остром течении, но менее выражены. Болезнь продолжается до 7 дней и более. У животных на различных частях тела (чаще на груди, животе, вымени, лопатках, голове, в области анального отверстия) появляются отеки.

Хроническое течение (2...3 мес) проявляется исхуданием, инфильтратами под нижней челюстью и поражением подчелюстных и заглоточных лимфатических узлов.

Abortивное течение болезни проявляется незначительным подъемом температуры тела, угнетением, потерей аппетита, уменьшением секреции молока, истощением животного. Продолжительность болезни обычно до 2 нед, редко больше. Больное животное, как правило, выздоравливает.

Карбункулезная форма болезни может быть первичной (место внедрения возбудителя), или карбункулы образуются как вторичные признаки при остром или подостром течении. Они могут появляться в различных частях тела животного, но чаще — в области головы, груди, плеч и живота. Вначале появляются плотные, горячие и болезненные припухлости, затем они становятся холодными, безболезненными и тестоватыми. В центре припухлости ткань некротизируется и распадается, в результате чего образуется язва. *Кишечная форма* проявляется расстройством функции органов пищеварения. Запор у больных животных сменяется диареей, экскременты с примесью крови. У лошадей отмечают сильные колики. Болезнь сопровождается высокой температурой.

Легочная форма характеризуется признаками прогрессирующей геморрагической пневмонии и острого отека легких.

Ангинозная форма сибирской язвы преобладает у свиней. Инфекция не принимает характера септицемии, а протекает большей частью локализование, в форме ангины или фарингита, выражающегося сильным опухлением в области гортани, переходящим на шею по ходу трахеи, на грудь и предплечье. При сильном отеке глотки и гортани животное может погибнуть от удушья. Температура тела у свиней может быть повышенной или нормальной. Иногда у свиней указанные признаки отсутствуют и болезнь проявляется в виде общего угнетения, слабости, отказа от корма, и подозрение на сибирскую язву возникает лишь при послеубойном осмотре туш.

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — крупная неподвижная грамположительная спорообразующая аэробная палочка, относящаяся к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. В организме восприимчивых животных и человека, а также при росте на богатых белком искусственных питательных средах образует капсулу, что характерно для вирулентных штаммов. Споры образуются при неблагоприятных для жизнедеятельности условиях — вне организма. В невскрытых трупах, в живом организме, при t ниже 12^0 С и выше 45^0 С — споры не образуются. В мазках из патологического материала бациллы антракса расположены одиночно или попарно, реже — короткими цепочками; в мазках из культур обнаруживают длинные цепочки. В мазках концы палочек в цепочках выглядят обрубленными, а вид цепочек напоминает бамбуковую трость.

По способу дыхания возбудитель сибирской язвы относится к факультативным анаэробам. Оптимальная температура роста $35—37^0$ С и рН $7,4—8,0$. Микроб нетребователен к питательным средам: растет в настоях соломы, на поверхности сырого и вареного картофеля, моркови, свеклы и др. На МПА через 24 ч роста появляются колонии: серебристо-серые, зернистые, диаметром 3—5 мм, с бахромчатыми краями и отходящими от них пучками нитей, напоминающими голову медузы или львиную гриву. Такой рост (R-форма) характерен для вирулентных штаммов. В старых культурах появляются гладкие S-формы колоний, авирулентные. В бульоне через 18—24 ч образуется осадок в виде комочка ваты, а сам бульон остается прозрачным.

Биохимическая активность: разлагает глюкозу, мальтозу, сахарозу с образованием кислоты, молоко медленно свертывает и пептонизирует. Характерен рост в столбике желатина: в виде «опрокинутой елочки», позже желатин разжижается в виде воронки; на кровяном агаре не дает гемолиза, чем отличается от сходных с ним почвенных и ложносибиреязвенных бацилл.

Токсикообразование. Продуцирует сильнейший экзотоксин, который вместе с капсулой обуславливает вирулентность. С экзотоксином связывают воспалительное и летальное действие возбудителя. Обнаружено, что токсин также подавляет фагоцитарную активность лейкоцитов. Токсин вызывает в организме повышение проницаемости сосудов, расстройство дыхания вследствие поражения центральной нервной системы, изменяет клеточный и химический состав крови. Он состоит из 3 факторов: протективного антагена (PA); летального (LF) и эдематогенного фактора (EF).

Антигенная структура. Бациллы антракса обладают сложной антигенной структурой. Выделены: оболочечный АГ, соматический АГ, капсулный АГ; протективный АГ экзотоксина. Только на последний синтезируются защитные антитела.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Вегетативные формы микробы малоустойчивы. В мягких тканях невскрытого трупа они разрушаются под действием протеолитических ферментов через 7 дней.. При 60^0 С погибают через 15 мин, при 100^0 С — мгновенно, под действием прямых лучей солнца — через несколько часов, быстро гибнут при воздействии общепринятыми дезинфицирующими средствами. При низкой температуре (-10^0 С) вегетативные клетки выживают 24 дня, в замороженном мясе (при $t = -15^0$ С) выживают до 15 дней. Споры возбудителя сибирской язвы высокорезистентны. Не погибают в разлагающемся трупном материале, десятками лет сохраняются в почве в почве. Сухой жар при $120...140^0$ С убивает их через 2...4 часа, автоклавирование при 120^0 С убивает за 5... 10 мин, кипячение — за 30 мин. По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам споры возбудителя сибирской язвы относятся к особо устойчивым (4-я группа). Дезинфицирующие растворы (сулема 1 : 1000, 5% раствор карболовой кислоты, 5—10% раствор хлорамина) убивают их только за несколько часов, а этиловый спирт в концентрациях от 25% до абсолютного — за 50 дней). Для дезинфекции применяют: растворы хлорной извести; 10%-ный горячий гидроксид натрия; 37%-ный формальдегид

в форме аэрозоля, 20%-ный раствор пероксида водорода с добавлением 5%-ной уксусной кислоты в форме аэрозоля, 7%-ный раствор пероксида водорода и др.

Патогенность. Более восприимчивы: крупный и мелкий рогатый скот, буйволы, лошади, ослы, олени, верблюды. Менее восприимчивы - свиньи. Дикие копытные (лоси, горные бараны, косули, зубры, дикие кабаны, антилопы, жирафы) чувствительны к сибирской язве. Малочувствительны плотоядные — лисицы, шакалы, койоты, собаки, кошки и птицы (грифы, ястребы, кобчики). Зарегистрирована болезнь среди грызунов (зайцы, крысы, мыши и др.). Не болеют пресмыкающиеся, земноводные, рыбы и беспозвоночные. Молодые животные более восприимчивы, чем взрослые. Источники и резервуары возбудителя инфекции: больные животные; дикие (лисицы, шакалы, койоты); домашние плотоядные (собаки, кошки); хищные птицы (грифы, ястребы, кобчики). Основной способ заражения — алиментарный через корм и воду; трансмиссивный при наличии кровососущих насекомых (слепни, мухи-жигалки, клещи и др.); аэрогенный (чаще овцы при вдыхании пыли, содержащей споры возбудителя). Пути выделения возбудителя — с секретами и экскретами. Факторы передачи возбудителя — контамированные сибиреязвенными спорами объекты внешней среды (навоз, подстилка, корма, помещения, предметы ухода, сырье и продукты животноводства, почва). Самый опасный фактор передачи — труп погибшего животного.

Патогенез. Возбудитель сибирской язвы, проникнув в организм, в первую очередь попадает и размножается в лимфоидно-макрофагальной системе, образуя при этом защитные капсулы и вырабатывая агрессины, парализующие фагоцитарную деятельность лейкоцитов и клеток ретикулоэндотелиальной системы, что способствует размножению возбудителя. Важнейшее патогенетическое значение имеют экзотоксин и капсулное вещество бацилл. Наличие капсул предотвращает фагоцитоз, а токсин разрушает клетки, фиксировавшие бациллы.

Действие агрессинов нарушает проницаемость эндотелия сосудов, ухудшает кровообращение, приводит к застою, общей интоксикации организма. В пораженном организме происходит экссудация жидкости в полости и ткани, появляются кровоизлияния. Агрессины, поступая в кровь, нейтрализуют факторы защитных сил организма, способствуют активному размножению возбудителя. Токсичные продукты распада попадают в головной мозг, вызывая его поражение. Беспрепятственное размножение возбудителя за короткое время приводит к общей септицемии и гибели животного. Прогрессирует гипоксия, нарушается кислотно-основное состояние, кровь теряет способность свертываться. При заражении ослабленного животного высоковирулентным штаммом возбудителя септицемия может развиваться сразу и смерть наступает уже через несколько часов. Карбункулы, возникающие при заражении животного через поврежденную кожу или вторично, представляют собой очаги серозно-геморрагического воспаления в местах локализации бацилл. Они размножаются в этих очагах и продуцируют экзотоксин, вызывая явления интоксикации. Затем бациллы проникают в регионарные лимфатические узлы, вызывая геморрагический лимфаденит, а из лимфатических узлов — в кровь. Таким образом, и в этих случаях может развиваться септицемия.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика сибирской язвы.

Лабораторная диагностика сибирской язвы в первую очередь предусматривает выделение возбудителя. Основная схема лабораторного исследования патологического материала включает: микроскопию окрашенного мазка, посев на питательные среды, заражение лабораторных животных, постановку серологических реакций (РП, РИФ, ИФА).

По результатам лабораторных исследований диагноз на сибирскую язву считается установленным при получении одного из следующих показателей: 1) выделения из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя

сибирской язвы, и гибели хотя бы одного лабораторного животных из двух зараженных исходным материалом или полученной культурой с последующим выщелением ее из органов павшего животного; 2) отсутствии в посевах из исходного материала роста культуры, но гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных и выделению из его органов культуры с признаками, характерными для возбудителя сибирской язвы; 3) положительной реакции преципитации при исследовании кожсырья и загнившего патологического материала. Для дифференциации возбудителя сибирской язвы от микробов-сапрофитов, близкородственных *B. anthracis* (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* и др.), широко распространенных в природе, применяют методы, выявляющие фенотипические различия штаммов, в том числе определение характера роста на различных питательных средах, чувствительность к пенициллину и бактериофагу, образование капсул, тест на образование сибираезвенного токсина, РП в геле, РИГА в комплексе с другими бактериологическими методами (микроскопия, культивирование, биопроба на лабораторных животных) и др.

В настоящее время при диагностике широко используется ПЦР. Иммунитет, специфическая профилактика. У переболевших сибирской язвой животных развивается стойкий и продолжительный иммунитет. Основу профилактики и борьбы с сибирской язвой в настоящее время составляют средства специфической профилактики — вакцины. Длительно в нашей стране применялась вакцина СТИ, в настоящее время для создания активного искусственного иммунитета широко используют живую споровую лиофилизированную вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ и аналогичную жидкую вакцину. Иммунитет формируется через 10 дней после прививки и сохраняется более 1 года. Разработаны две формы сибираезвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ: концентрированная и суперконцентрированная, и способ их внутрикожного применения при помощи безыгольного инъектора (крупный рогатый скот, свиньи). Создана также универсальная вакцина против сибирской язвы человека и животных «УНИВАК», которую вводят безыгольным способом или подкожно шприцем. Иммунитет развивается через 7 дней, продолжительность 1,5 года. Возможно использование ассоциированных вакцин: против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула; против сибирской язвы и ящура; против сибирской язвы и клостридиозов овец; против сибирской язвы и оспы овец. Разрабатываются также современные сибираезвенные вакцины нового поколения с получением рекомбинантных штаммов, обеспечивающих формирование более длительного иммунитета.

1.20 Лекция №20 (2 часа).

Тема: «Возбудители клостридиозов».

1.20.1 Вопросы лекции:

1 Характеристика возбудителя эмфизематозного карбункула, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика эмкара.

2 Характеристика возбудителя столбняка, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика столбняка.

3 Характеристика возбудителя ботулизма, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика ботулизма.

1.20.2 Краткое содержание вопросов:

1 Характеристика возбудителя эмфизематозного карбункула, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика эмкара.

Эмфизематозный карбункул — это острое инфекционное заболевание крупного рогатого скота (реже мелкого рогатого скота), характеризующееся развитием крепитирующих отеков в мышечной ткани, хромотой и быстрой гибелью. Распространен

почти во всех странах мира с развитым скотоводством, встречается также и в нашей стране.

Морфология возбудителя эмкара *C. chauvoei* - прямые или слегка изогнутые с закругленными концами палочки шириной 0,6-1,0 мкм и длиной 2-8 мкм. В препаратах из тканей располагаются одиночно, парами, очень редко по 3-4, нитей не образуют. Микроб обладает значительным полиморфизмом, особенно в мазках из животных тканей, где нередко приобретает форму веретена, лимона, груши, шара и т. д. Капсулы не имеет, подвижный (перитрих). В организме и внешней среде образует центрально и субтерминально расположенную спору. По Граму в молодых культурах и препаратах из тканей красятся положительно, в старых культурах - отрицательно.

Культивирование. *C. chauvoei* - строгий анаэроб, требует создания вакуума не менее 8-15 мм ртутного столба. Для культивирования применяют специальные среды: среду Китта-Тароцци, бульон Мартена, мозговую среду, полужидкий агар, глюкозо-кровяной агар, глюкозный агар с 10-12% бычьей сыворотки. Оптимальные значения рН 7,2-7,6, температуры 36-38°C, рост возможен и при 14°C. В среде Китта-Тароцци уже через 12-24 ч дает пышный рост с газообразованием и легким помутнением, на 2-3-и сут среда светлеет и на дно выпадает рыхлый беловатый осадок, аналогично растет и в бульоне Мартена. Молодые культуры запаха не издают, в старых обнаруживается запах прогорклого масла. При росте в мозговой среде почернения не наступает. В глубине сывороточного агара растет в форме чечевицеобразных или круглых колоний с нежными отростками. На пластинке глюкозо-кровяного агара Цейссlera через 24-48 ч инкубирования вырастают круглые, в виде перламутровой пуговицы или в форме виноградного листа, плоские, с ровным краем и приподнятым центром колонии, окруженные зоной прозрачного гемолиза.

Биохимические свойства. Синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатин; свернутую сыворотку и яичный белок не разжижает; коагулирует молоко на 3-6-е сут роста, сгусток его имеет вид мягкой губчатой массы, пептопиазия сгустка не наступает. Индол не образует, большинство штаммов продуцируют незначительное количество сероводорода, нитраты в нитриты не редуцируют. Каталазу и лецитиназу не вырабатывает. Расщепляет с образованием кислоты и газа глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, галактозу, левулезу и не разлагает маннит, салицин, глицерин, дульцит и инулин. Отношение разных штаммов к сахарам непостоянно, однако реакции на сахарозу и салицин являются индикаторными: *C. chauvoei* в отличие от *C. septicum* ферментирует сахарозу и не сбраживает салицин.

Токсинообразование. *C. chauvoei* синтезирует и выделяет экзотоксин. Образование его происходит как в организме, так и при выращивании микробы в жидких питательных средах. В составе токсина обнаружены гемотоксический и некротизирующий компоненты. Токсин обладает антигенной функцией и при обработке формалином переводится в анатоксин.

Антигенная структура. Выделены термостабильный соматический О-антител и термолабильный жгутиковый Н-антител. Они обладают видовой специфичностью и являются общими у всех штаммов.

Устойчивость. Вегетативная форма *C. chauvoei* малоустойчива к воздействию различных факторов внешней среды, споры же весьма резистентны. В гниющих трупах споры сохраняются до 3 мес, в навозе с примесью крови и остатками тканей до 6 мес, а на дне водоемов неблагополучных территорий - свыше 10 лет. В кислых почвах, бедных органическими веществами, споры погибают значительно раньше. Имеются предположения, что в почве споры сохраняют жизнеспособность до 20-25 лет. При соответствующих условиях в почве могут вегетировать и размножаться. Споры *C. chauvoei* в гниющих мышцах погибают через 6 мес, в высушенных мышцах выдерживают кипячение до 6 ч, а в свежем мясе - до 2 ч, в солонине сохраняются более 2 лет. В высушенном состоянии споры теряют жизнеспособность при нагревании до температуры

100-105°C за 2-12 мин, при 80°C - через 2 ч, но не разрушаются текучим паром на протяжении 40-50 мин. Прямые солнечные лучи убивают их через 24 ч. На споры возбудителя губительно действует 3%-ный раствор формалина в течение 10-15 мин, 3%-ный фенол действует слабо. В 6%-ном растворе гидроокиси натрия они погибают через 6-7 дней, в 12%-ном растворе - через 24 ч, в 25%-ном через 14 ч, но в подогретом до 40°C - через 50 мин.

Патогенность. В естественных условиях - преимущественно более крупный рогатый скот и овцы. Редкие случаи заболевания наблюдают у коз, буйволов, оленей и лосей.

Наиболее восприимчив молодняк крупного рогатого скота в возрасте от 3 мес до 4 лет. Животные старше 4 лет резистентны за счет иммунизирующей субинфекци, телята до 3-месячного возраста - благодаря колостральному иммунитету. Племенные животные, особенно мясных пород, более восприимчивы, чем степной и рабочий скот. Независимо от породы повышенной чувствительностью обладают упитанные животные: их мышечная ткань содержит больше гликогена, необходимого для развития микробы. Из лабораторных животных наиболее восприимчивы морские свинки, они гибнут через 16-48 ч с момента заражения

Возбудитель эмкара обладает ферментами патогенности. К ним относятся дезоксирибонуклеаза (фактор бета), гиалуронидаза (фактор гамма), токсическим компонентом является и фактор дельта - кислородолабильный гемолизин; лецитиназу не содержит.

Патогенез. Заражение происходит при попадании спор в пищеварительный тракт с кормом и питьевой водой. Проникновению спор способствуют травмы слизистой оболочки, в том числе и микротравмы. Личинки оводов, мигрируя из пищеварительного канала в мышцы, способствуют внедрению возбудителя эмфизематозного карбункула и создают условия для его размножения. Возбудитель может проникать также через ранки на поверхности тела, среди которых важная роль отводится укусам кровососущих насекомых. С током крови возбудитель попадает в мышцы и места, наиболее благоприятные для его развития гематомы, размозженные и разорванные ткани, участки некроза. Первичный очаг инфекционного процесса возникает после короткого инкубационного периода и имеет тенденцию к бурному развитию. В местах оседания микробы интенсивно размножаются, выделяют токсин и образуют газ. Компоненты токсина подавляют фагоцитоз, вызывают нарушение целостности кровеносных сосудов и другие повреждения, ведущие к отеку и некрозу тканей, газы же обуславливают крепитацию образовавшихся отечных припухлостей. Продукты распада тканей и токсины возбудителя являются причинами развития лихорадки, нарушения сердечной деятельности и расстройства дыхания. Перед гибелью животных резко повышается концентрация микробов в тканях и отмечается бактериемия. Инфекционный процесс может протекать и без образования карбункула в виде сепсиса.

Лабораторная диагностика. Материалом для лабораторного диагноза служат кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного. Вскрытие трупов животных, погибших от эмфизематозного карбункула, запрещено (почвенная инфекция). Поэтому кусочки мышц отбирают без полного вскрытия трупа. Если же труп случайно вскрыт, берут кусочки паренхиматозных органов. Исследование проводят по схеме: микроскопия мазков, посевы на питательные среды в анаэробных и аэробных условиях и заражение лабораторных животных.

Иммунитет и средства профилактики. В результате переболевания животные приобретают длительный активный иммунитет. Иммунитет при эмфизематозном карбункуле антитоксический и антимикробный. Для иммунизации используют: концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец, живую вакцину из штамма № 2/14; ассоциированную живую вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула.

2 Характеристика возбудителя столбняка, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика столбняка.

Столбняк – это остро протекающая инфекция, характеризующаяся повышенной возбудимостью и судорожным сокращением всей мускулатуры тела или отдельных групп мышц под воздействием столбнячного токсина, образующегося в месте проникновения возбудителя в организм.

Инкубационный период при столбняке от 3 дней до 3 нед. Заболевание протекает чаще остро. У лошадей отмечают напряженную походку, ригидность жевательных мышц, неподвижность ушных раковин, затрудненный прием и проглатывание корма и выпадение третьего века. Дыхание становится частым и поверхностным, мышцы твердыми, хвост приподнят, живот подтянут, вдоль реберной дуги образуется запальный желоб, кал и моча выделяются с трудом. У крупного рогатого скота отмечают тимпанию, тонические судороги, ходульную походку, усиленное потоотделение. У овец и коз наблюдаются судорожные сокращения мышц шеи, запрокидывание головы на спину. У свиней поражаются обычно только мышцы головы: глазные яблоки повернуты наружу, третье веко выпадает, углы рта оттянуты назад. Продолжительность болезни 3-6 дней. Температура нормальная, но перед смертью повышается до 42-43 °С. Летальность от 45 до 100 %.

Возбудитель столбняка - *Clostridium tetani*. Открыт в 1883 г. русским хирургом Нестором Монастырским и в 1884 г. немецким медиком Артуром Николайером, выделен в чистую культуру в 1889 г. японским бактериологом Китасато Сибасабуро.

Морфология. *Clostridium tetani* – грамположительные прямые палочки длиной 4-8 мкм и толщиной 0,3-0,8 мкм, располагаются одинично или цепочками. Образуют споры круглой формы, расположенные терминально, палочка со спорой имеет вид барабанной палочки. Перитрихи, капсулу не образуют.

Культивирование. Облигатные анаэробы, культивируются в бескислородных условиях на агаре Цейссlera, образуют прозрачные или несколько сероватые колонии с зоной гемолиза. В высоком столбике агара *C.tetani* дают колонии двух видов: похожие на пушинку с плотным центром (S-форма) и чечевицеподобные (R-форма). В среде Китта–Тароцци эти анаэробы образуют равномерную муть.

Биохимические свойства. *C.tetani* не обладают сахаролитическими ферментами, не образуют каталазу и оксидазу, протеолитические свойства слабо выражены.

Антигенные свойства. Возбудитель имеет О- и Н-АГ. По Н-АГ делятся на 10 сероваров, но все они продуцируют идентичный по АГ свойствам экзотоксин.

Токсигенные свойства. Столбнячный токсин относится к экзотоксинам и состоит из 2 фракций: 1) тетаноспазмина (со свойствами нейротоксина, который поражает двигательные клетки центральной нервной системы и вызывает сокращение поперечно-полосатых мышц); 2) тетаногемолизина (лизирующего эритроциты). Экзотоксин является одним из сильнейших бактериальных ядов, уступая по силе лишь ботулиническому токсину. Он быстро разрушается под влиянием нагревания, солнечного света, щелочной среды. Ферменты и энзимы желудочно-кишечного тракта не разрушают токсин, но он не всасывается через слизистую оболочку кишечника.

Устойчивость во внешней среде. Споры устойчивы к высушиванию: на кусочке дерева сохраняются до 11 лет, при кипячении погибают через 1—3 ч, раствор сулемы (1:100) убивает их тоже через 3 ч. Споры столбняка обезвреживаются 1%-ным раствором азотнокислого серебра за 1 мин., 0,5%-ной соляной кислотой — через 30 мин, 5%-ным раствором карболовой кислоты — через 15 мин, 3%-ным раствором формалина — через 24 ч.

Патогенность и патогенез. Наиболее чувствительны к столбняку овцы, козы, лошади и свиньи. Смертность у овец и коз может достигать 90—100 %, у лошадей — 75—90, у крупного рогатого скота — 50—60 %. Возбудитель проникает в организм при различных ранениях. При наличии анаэробных условий в месте внедрения возбудителя он

размножается с выделением нейротоксина, который с кровотоком или по нервным стволам проникает в спинной и продолговатый мозг. Под влиянием токсина повышается рефлекторная возбудимость и появляются длительные (тетанические) судороги, которые затрудняют передвижение, прием корма, работу сердца, легких и т.д. Гибель животного наступает в результате паралича дыхательного центра и сердца, асфиксии и нарушения кровообращения.

Лабораторная диагностика. Лабораторная диагностика столбняка основана на результатах бактериологического исследования, которое включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, биохимическим и токсигенным свойствам.

Иммунитет и иммунопрофилактика. Иммунитет антитоксический. Для активной иммунизации животных используют концентрированный столбнячный анатоксин. Пассивную специфическую профилактику осуществляют использованием антитоксической противостолбнячной сыворотки.

3. Характеристика возбудителя ботулизма, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика ботулизма.

Ботулизм - это остро текущий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбудителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы. Инкубационный период при ботулизме от нескольких часов до двух недель. Болезнь может протекать молниеносно, остро, подостро и реже – хронически. У лошадей и крупного рогатого скота молниеносное течение характеризуется внезапной гибелью животных без каких-либо признаков болезни. Острое течение (длится от 1 до 4-х дней) проявляется беспокойством, снижением рефлекторной чувствительности, нарушением координации движений, гиперемией или желтушностью видимых слизистых оболочек. Наблюдаются слюнотечение, паралич нижней челюсти и языка, который выпадает изо рта. Летальность 90-95%. При подостром (до 7 дней) и хроническом (до 3-4 нед.) течениях болезни клинические признаки выражены слабее. У овец отмечают нарушения координации движений, изгибание шеи, паралич языка и слюнотечение (при остром течении). Свиньи болеют редко. У них отмечают обильное слюнотечение, нарушения координации движений, слепоту, паралич жевательных мышц и глотки.

Возбудитель ботулизма — *Clostridium botulinum*, открыт в 1896 г. Van Эрменгемом, который выделил его из зараженной ветчины, а также селезенки человека, погибшего от ботулизма.

Морфология. *C. botulinum* в окрашенных препаратах имеет вид палочек с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм. Бактерии располагаются изолированно или парам иногда в виде коротких цепочек. Микроб подвижен (перитрих) большинство клеток из старых культур без жгутиков. Образует споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально. Молодые культуры окрашиваются грамположительно, 4-5-суточные — грамотрицательно.

Культивирование. Строгие анаэробы. Оптимум pH для роста 7,3-7,6, для прорастания спор 6,0-7,2. На глюкозо-кровяном агаре образуют очень мелкие сероватые или мутные желтоватые колонии линзообразной формы (на различных средах у одного и того же штамма могут варьировать). Вокруг колонии образуются зоны гемолиза различной ширины. Хорошо растут на жидких средах (обычно на бульоне Тароцци, бульонах из гидролизатов казеина, мяса или рыбы) при условии предварительного удаления O₂ из среды кипячением в течение 15-20 мин с быстрым охлаждением. Вызывают помутнение среды и газообразование, иногда имеется запах прогорклого масла, но этот признак непостоянен.

Биохимические свойства. Все типы Clostridium botulinum образуют желатиназу, лецитиназу и H_2S , проявляют широкий спектр сахаролитической активности (бактерии типов А, В, Е и F ферментируют глюкозу, левулезу, фруктозу, мальтозу и сахарозу типов С и D — глюкозу и мальтозу, тип G инертен к углеводам). Clostridium botulinum типов А и В обладают выраженными протеолитическими свойствами, разлагают свернувшийся яичный белок и гидролизуют желатин

Антигенный состав. Серологическая идентификация Clostridium botulinum основана на выявлении токсинов, по их структуре бактерии разделяют на 7 сероваров — А, В, С, D, Е, F и G. Антигенная структура бактерий остается малоизученной, показано наличие жгутиковых, группоспецифических (Н) и соматических, типоспецифических (О) АГ, не проявляющих токсических свойств.

Токсинообразование. Оптимальная температура для токсинообразования вариабельна для бактерий типов А, В, С и D $35^{\circ}C$, для бактерий типов Е и F $28-30^{\circ}C$. Ботулотоксин — один из сильнейших известных в природе ядов, его смертельная доза для человека составляет около 0,3 мкг. Это белок, оказывающий нейротоксическое действие. Механизм биологической активности реализуется через связывание Н-цепи с мембраной, проникновение токсина в клетку, формирование пор в пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной. Токсин разрушается при кипячении, легко кристаллизуется в белый хлопьевидный порошок. Токсины всех типов также оказывают гемолизирующую действие.

Патогенность. Патогенность Clostridium botulinum различна для различных видов млекопитающих; заболевания человека вызывают бактерии типов А, В, Е и F; Clostridium botulinum типов С и D вызывают заболевания животных и птиц (в редких случаях от больных животных выделяют бактерии типов А и В). Патогенность типа G для человека и животных не доказана.

Патогенез. Попавший с кормом токсин всасывается через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и в больших количествах накапливается в тканях легких, печени и сердца, в желчи, моче и мозге. Ботулинический токсин является нейротоксином. В результате расстройства под его влиянием деятельности коры головного мозга развиваются параличи мышц глотки, языка, нижней челюсти, нарушения движения, параличи дыхательных мышц, асфиксия и смерть животного.

Лабораторная диагностика. Основана на результатах бактериологического исследования, которое включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и его токсина методом биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и токсигенным свойствам. Материал для исследования: пробы корма, вызвавшего отравление; от павших животных — содержимое желудка, кишечника, кусочки печени, селезенки; от больных животных — кровь.

Иммунитет и иммунопрофилактика. Иммунитет антитоксический. Внутривенно вводят противоботулиновые антитоксические моно- или поливалентные сыворотки. Специфическую профилактику ботулизма у животных, кроме норок и собак, не проводят.

1.21 Лекция №21 (2 часа).

Тема: «Возбудитель лептоспироза».

1.21.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя лептоспироза.

2 Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика лептоспироза.

1.21.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя лептоспироза.

Лептоспироз – это остро протекающая, чаще всего природно-очаговая болезнь животных многих видов и человека, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, гемоглобинурией или гематурией, геморрагиями, желтушным окрашиванием и очаговыми некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта,abortами, маститами, рождением нежизнеспособного потомства, периодической офтальмии, менингоэнцефалитами, снижением продуктивности животных.

Протекает остро, подостро, хронически и бессимптомно. У свиней, взрослого крупного рогатого скота, лошадей, овец и коз протекает преимущественно бессимптомно. Независимо от течения болезни в крови животного выявляются специфические антитела на 5-7 день после заражения, а через 10-20 дней развивается лептоспироносительство. Острое течение среди сельскохозяйственных животных чаще наблюдается у молодняка, сопровождается кратковременной лихорадкой, гематурией, иногда желтушным окрашиванием и некрозами слизистых и отдельных участков кожи, нарушением функции желудочно-кишечного тракта (понос, запор). При подостром течении отмечаются те же симптомы, но менее выраженные. При хроническом признаки выражены слабо, прогрессируют исхудание и снижение продуктивности.

Возбудитель инфекции относится к роду *Leptospira* (от греч. *leptos* — мелкий, *spira* — завиток), семейству - *Tripanemaceae*. Открыт японскими исследователями Инада и Идо в 1914 г. Выделено 124 серологических типа патогенных лептоспир, объединенных по общности антигенов в 18 серологических групп. Все паразитические лептоспирсы в соответствии с предложением Всемирной организации здравоохранения относят к одному виду — *L. interrogans*. Сапрофитные лептоспирсы объединены в вид *L. biflexa*, обнаруженный в прудовой воде. Наиболее часто возбудителями лептоспироза являются следующие серотипы лептоспир: *L. pomona*, *L. tarassovi*; *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hebdomadis* и др.

Морфология. Лептоспирсы различных серологических групп имеют одинаковые морфологические свойства. Длина лептоспир колеблется от 3 до 30 мкм и более, в среднем 7...15 мкм, ширина 0,06...0,15 мкм. Лептоспирсы — грамотрицательные бактерии. Поскольку они плохо воспринимают окраску, их обычно исследуют в неокрашенном состоянии. Готовят препарат «раздавленная капля» и изучают методом темнопольной микроскопии. Лептоспирсы имеют вид тонких серебристо-белых нитей с нежной спиральной структурой. Длина их 5—18 мкм, диаметр 0,05—0,14 мкм. Лептоспира имеет тонкую ригидную центральную осевую нить, вокруг которой равномерными завитками обвита цитоплазматическая спираль. Тело лептоспирсы, состоящее из правильных, почти соприкасающихся завитков спирали, постепенно утончается к концам, которые в большинстве случаев загнуты под углом и имеют пуговчатые утолщения. Помимо первичных завитков у лептоспир обнаруживают более крупные вторичные завитки, обусловливающие изгибы ее тела, вследствие чего микроорганизмы приобретают форму букв S, C, X.. Осевая нить служит органом движения. Лептоспирсы плохо окрашиваются анилиновыми красками, но хорошо импрегнируются серебром по методу Лёвадити.

Культуральные свойства. Лептоспирсы являются аэробами, их культивируют на средах слабощелочной реакции (рН 7,2—7,4) при 24—28°C. Культивирование лептоспир связано с трудностями, обусловленными их низкой способностью к размножению в жидкких, полужидких и особенно на плотных искусственных питательных средах. На простых питательных средах лептоспирсы не растут. Для их культивирования наиболее часто используют жидкие среды Любашенко, Терских, Ферворт — Вольфа, содержащие 5—10% сыворотки крови кроликов, а также среду ГНКИ с альбумином. Максимальное накопление биомассы лептоспир отмечается по истечении 5—7 сут культивирования, при этом вид питательных сред не изменяется.

Ферментативные свойства. Биохимическая активность лептоспир незначительна. Они сбраживают глюкозу и сахарозу с образованием кислоты при условии концентрации углеводов в среде не более 0,25—0,5%. Лептоспирсы не обладают протеолитическими свойствами.

Антигенные свойства. Обладают белковым соматическим антигеном, определяющим их видовую принадлежность. Поверхностные полисахаридные антигены служат критериями для групповой и серовариантной принадлежности.

Токсинообразование. Образуют эндотоксин.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Устойчивость. Лептоспирсы неустойчивы к воздействиям внешних факторов. Прямые солнечные лучи убивают их в течение 0,5—2 ч. Высушивание на лептоспир действует также губительно. В воде открытых водоемов лептоспирсы выживают от нескольких часов до 30 сут. При кипячении культуры они гибнут моментально, а при нагревании до 56°C — через 30 мин. Очень устойчивы лептоспирсы к низким температурам. Выживаемость микроорганизмов в пищевых продуктах зависит от pH среды. Кислая реакция губительно действует на лептоспирсы. Так, в кислом молоке они гибнут в течение 10 мин. Мясо от больных животных обеззараживается при содержании в нем соли 4,8% в течение 10 сут. 20%-ный этиловый спирт, 2%-ная хлористоводородная кислота, 0,5%-ный раствор фенола, 0,5%-ный раствор едкого натра, 0,25%-ный формалин убивают лептоспир в течение 5 мин.

Патогенность. К лептоспирозу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, лошади, собаки, буйволы, верблюды, олени, кошки, ослы, лисицы, песцы, куры, утки, мышевидные грызуны. Более восприимчивы к лептоспирозу молодые животные. Из лабораторных животных к лептоспиралам наиболее чувствительны золотистые хомяки. Основным источником инфекции являются грызуны, а также больные и переболевшие сельскохозяйственные животные, которые длительное время могут оставаться лептоспироносителями.

Патогенез. Воротами инфекции для лептоспир являются слизистые оболочки пищеварительного тракта, носоглотки, иногда — половых органов и мочевыводящих путей, а также повреждения кожных покровов. В области внедрения возбудителя никаких патологических изменений не отмечается. Лептоспирсы распространяются с током лимфы, оседая в лимфоузлах, размножаясь там, и по кровеносной системе рассеиваясь по органам и системам. Лептоспирсы тропны к макроцитарным фагоцитам, склонны накапливаться в тканях печени, селезенки и почек (иногда — в легких) вызывая местное воспаление. Лизис лептоспир сопровождается накоплением токсинов, под действием которых повышается проницаемость кровеносных сосудов, лизируются эритроциты, происходят кровоизлияния, развивается гематурия, желтуха, поражается центральная нервная система. Токсикоз может привести к гибели животного.

3. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика лептоспироза.

Лабораторная диагностика. После убоя животного для исследования берут мочу, почки, кусочки печени и других, паренхиматозных органов. Лептоспироз устанавливают на основании микроскопии, выделения чистых культур лептоспир и постановки биопробы и исследование сыворотки крови по реакции микроагглютинации (РМА), РА. Разработана ПЦР-диагностика.

Иммунитет и средства специфической профилактики. После переболевания формируется длительный и напряженный иммунитет. Ведущую роль играет гуморальный иммунитет.

Для профилактики используют вакцину поливалентную "ВГНКИ" против лептоспироза животных, для пассивной иммунизации и лечения — гипериммунную сыворотку против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Введение в дисциплину. Предмет, задачи, связь с другими науками. История развития. Техника безопасности при работе в бак. лаборатории

2.1.1 Цель работы: Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Познакомиться с оборудованием, посудой и инструментами для работы с культурами микроорганизмов.
3. Освоить правила работы с культурами микроорганизмов.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, шпатели Дригальского, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера

2.1.4 Описание (ход) работы:

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения чистоты и порядка для обеспечения стерильности исследований и во избежание загрязнений культур микроорганизмов.

В микробиологической лаборатории ежедневно проводят влажную уборку, производят дезинфекцию воздуха путем проветривания (30-60 мин.) и облучения ультрафиолетовыми лучами от 30 минут до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха. Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают растворами различных дезинфицирующих веществ (2-3 % раствором соды, 3-5 % раствором фенола, 0,3 % водным раствором хлорамина).

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать до начала и после окончания работы (70 % раствором этилового спирта, 0,5-3 % водным раствором хлорамина).

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. Работу производить только в халатах и сменной обуви.
2. В лаборатории запрещается курение, прием пищи.
3. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов; все реактивы, растворы, микробиологическая посуда с питательными средами и культурами микроорганизмов должны быть подписаны.
4. Все предметы, использованные при работе с живыми микроорганизмами, должны быть обеззаражены, либо обжиганием в пламени (петли, крючки, пинцеты), либо погружением в дезинфицирующий раствор (3-5 % водный раствор фенола или 2 % раствор хлорамина) (стеклянные пипетки, шпатели).
5. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки.

Оборудование, посуда и инструменты для работы с культурами микроорганизмов

В микробиологической лаборатории используется следующее оборудование: термостат, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная для роста микроорганизмов температура; качалки и ферментеры для культивирования микроорганизмов; сушильные шкафы и автоклавы для стерилизации питательных сред, посуды и инструментов; бактерицидные лампы для дезинфекции помещений, ламинарные боксы, микроскопы и т.д.

Для культивирования микроорганизмов используется следующая стеклянная посуда: качалочные колбы, конические колбы, чашки Петри, пробирки, матрацы (рис. 1).

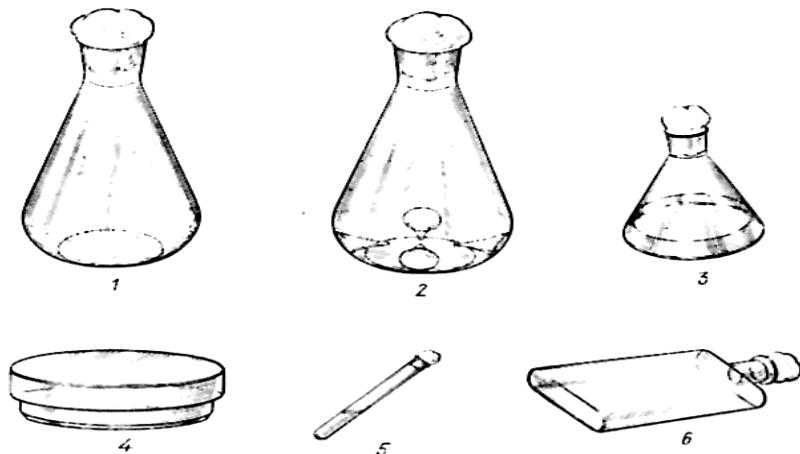


Рис 1. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1- качалочная колба; 2- качалочная колба с отбойниками; 3- коническая колба; 4- чашка Петри; 5- пробирка; 6- матрац.

В качестве инструментов для посева и приготовления препаратов используют бактериологические петли, иглы, крючки, стеклянные пипетки, шпатели Дригальского.

Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Процесс выращивания микроорганизмов в искусственных условиях в питательной среде называется культивированием. При этом выращенные клетки определенного вида микроорганизмов называются культурой микроорганизмов.

Все действия следует проводить около пламени горелки (но не в пламени) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. Для разлива питательной среды в чашки Петри сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом. Распределение микроорганизмов по поверхности питательной среды называют рассевом. Перенос уже выращенных микроорганизмов из одной среды в другую – пересевом. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей (если микроорганизмы выращены на плотной питательной среде) или стерильной пипеткой (если микроорганизмы выращены в жидкой среде). Перед взятием клеток микроорганизмов петлю стерилизуют, обжигая саму петлю и часть

держателя в пламени спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Систематика и морфология микроорганизмов»

2.2.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.

2.2.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.

2. Ознакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бинокулярные микроскопы, микропрепараты из микроорганизмов, иммерсионное масло.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Работа 1.

Задание.

1. Ознакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним.

Разобрать и нарисовать в тетради схему образования изображения в световом микроскопе (рис. 4), рисунок 5 и таблицу 1.

2. Вычислить предел разрешения для разных объективов микроскопа при $\lambda = 0,55 \text{ мкм}$.

Работа 2.

Задание. Рассмотреть демонстрационный препарат: «раздавленная» капля из дрожжей, при иммерсионной и фазово-контрастной микроскопии. Рассмотреть окрашенный флюорохромом препарат из дрожжей под люминесцентным микроскопом. Необходимо обратить внимание на качество изображения объектов. Сравнить способы микроскопии.

Заполнить таблицу.

Таблица

| Исследуемый материал | Микроскопический метод исследования | | |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| | Иммерсионная микроскопия (рис.) | Фазово-контрастная микроскопия (рис.) | Флуоресцентная микроскопия (рис.) |
| | | | |

Контрольные вопросы: 1. Какие преимущества имеет метод флуоресцентной микроскопии? 2. Какой принцип лежит в основе фазово-контрастной микроскопии?

Работа 3.

Задание. Рассмотреть два демонстрационных препарата: 1. Смесь эритроцитов и палочек. Окраска фуксином. 2. Смесь дрожжей и кокков. Окраска метиленовым синим.

Подготовка микроскопа для работы: поднять конденсор до уровня предметного столика, полностью открыть диафрагму, поставить плоское (при естественном освещении) или вогнутое (при искусственном освещении) зеркало.

Осветить поле зрения под контролем объектива x8. Нанести на препарат каплю масла, положить препарат на столик микроскопа и закрепить. Установить иммерсионный объектив. Под наблюдением медленно опустить объектив макровинтом до погружения в масло. Затем, глядя в окуляр, медленно поднимать объектив до появления объекта.

Провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его только в пределах одного оборота.

Заполнить таблицу.

Таблица

| Исследуемый материал | Иммерсионная микроскопия | |
|----------------------|--------------------------|---------------|
| | Рисунок | Метод окраски |
| | | |
| | | |

Контрольные вопросы: 1. Устройство светового микроскопа. 2. Правила работы с иммерсионным объективом. 3. Основные характеристики светового микроскопа. Разрешающая способность микроскопа. Общее увеличение микроскопа. Полезное увеличение микроскопа. 4. Контраст в световом микроскопе и его повышение (фазово-контрастная микроскопия, микроскопия в темном поле). 5. Люминесцентная микроскопия. 6. Электронная микроскопия.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа).

Тема: «Особенности морфологии микроскопических грибов»

2.3.1 Цель работы: Изучить морфологические особенности представителей микроскопических грибов различных классов. Ознакомиться с методами исследования микроскопических грибов.

2.3.2 Задачи работы:

Изучить морфологические особенности представителей микроскопических грибов различных классов. Ознакомиться с методами исследования микроскопических грибов.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры плесневых грибов, бактериологические петли, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, лупы

2.3.4 Описание (ход) работы:

Грибы – хемоорганотрофные эукариотические микроорганизмы, лишенные фотосинтетических пигментов. Широко распространены в природе. Грибы относятся к царству Mycota в который входят истинные грибы (Eumycota) и слизневики. Слизневики - (Mucromycota) Миксомицеты, своеобразные организмы, встречающиеся в виде слизистой массы и передвигаются подобно амебам. В этой массе не разделенной на клетки много ядер. Размножаются простым делением. В некоторые периоды времени слизистые массы соединяются друг с другом и образуют плодовое тело в котором возникают споры. Среди миксомицетов есть паразиты растений, они вызывают, например Килу капусты. Истинные грибы (Eumycota) делятся на 6 классов:

1. Хитридиомицеты (Chytridiomycetes)
2. Оомицеты (Oomycetes)
3. Зигомицеты (Zygomycetes)
4. Аскомицеты (Ascomycetes)
5. Базидиомицеты (Basidiomycetes)
6. Дейтеромицеты (Deuteromycetes) или Fungi imperfecti) несовершенные грибы.

• Хитридиомицеты характеризуются отсутствием мицелия или он находится в зародышевом состоянии. Клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Размножение бесполое. Это преимущественно водные организмы, встречаются в почве и на растениях. Среди представителей этого класса встречаются возбудители болезней у растений. Зооспоры и гаметы имеют жгутики.

- Оомицеты одноклеточные мицелиальные грибы, функцию скелетного вещества оболочки выполняют целлюлоза и глюкан, размножение бесполое. Обитают в водоемах и на растениях. Многие оомицеты облигатные паразиты, которые проводят полный жизненный цикл на растениях хозяина. Среди них встречаются фитопатогенные виды.

- Зигомицеты.(Фикомицеты) Мицелий хорошо развит несептированный (низшие грибы). Оболочки содержат хитин, иногда глюкан, размножение спорангиспорами, реже конидиями или половым путем. Широко распространены в почве на органических остатках растений. Эти грибы используются в микробиологической промышленности для получения соевого сыра, антибиотика рамицина. Включает 3 рода:Мукор,тамнидиум и ризопус.

- Класс Аскомицеты или сумчатые грибы представляют собой высшие многоклеточные грибы.Их мицелий разделен на отдельные клетки (септирован). Размножение вегетативное бесполое экзоспорами(конидиями), при половом аскоспорами - сумчатая стадия. В результате полового процесса возникают АСКИ или сумки, в которых после слияния ядер половых клеток - образуются аскоспоры содержащие обычно по 8 аскоспор. В одной аске.

- Базидиомицеты - высшие многоклеточные грибы с септированным мицелием. Сюда относятся шляпочные грибы, а также грибы паразиты злаковых растений (ржавчинные, головневые).

- Дейтеромицеты класс несовершенных грибов. Размножение посредством экзоспор (конидиями, а также отдельными кусочками мицелия. Конидии различные по форме и окраске. К дейтеромицетам относят дерматомицеты - возбудители трихофитии, микросплирии, фавуса. Животных и человека, а также дрожжеподобные грибы *Candida*, *Cryptosporascus*, грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*. У гриба рода *Penicillium* (зеленый кистевик) мицелий и конидиеносцы многоклеточные, в верхней части конидиеносца имеется мутовчатое разветвление в виде кисти руки. На них находятся стеригмы от которых отшнуровываются конидии (споры). Обитают в почве сырых помещений кормах.У гриба рода аспергиллиус (лечебная плесень) мицелий септирован, конидиеносцы одноклеточные. Конидиеносцы имеют в верхней части шаровидное утолщение на котором располагаются стеригмы - от них отшнуровываются конидии.

Морфология грибов

У большинства видов грибов вегетативное тело (*тэллом*) состоит из ветвящихся нитевидных клеток – *гифов*, образующих *мицелий* или *грибницу*.

Различают мицелий субстратный и воздушный. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра к периферии. У некоторых грибов для прикрепления к субстрату существуют специальные ризоиды – корешкообразные выросты. К видоизмененному мицелию относят также склероции – округлые или продолговатые сплетения гифов, содержащие много питательных веществ, необходимые грибам в неблагоприятных условиях.

По строению мицелия грибы подразделяются на низшие грибы (фикомицеты) и высшие грибы (микомицеты). Низшие грибы имеют несептированный мицелий, представленный одной разветвленной гигантской клеткой без перегородок со множеством ядер. Высшие грибы характеризуются септированным мицелием, гифы разделены перегородками (септами) на отдельные одноядерные или многоядерные клетки. У некоторых высших грибов – дрожжей, мицелий отсутствует, а вегетативное тело представлено отдельными клетками с клеточной стенкой.

Способы размножения грибов. Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения. Вегетативный способ размножения происходит без участия специальных органов, простым распадением мицелия на обособленные клетки: хламидоспоры; оидии; артроспоры; бластоспоры.

Репродуктивный способ включает бесполое и половое размножение.

Бесполое размножение осуществляют особые клетки, которые развиваются эндогенно (спорангииоспоры, зооспоры) или экзогенно (конидии). Половое размножение происходит в результате слияния ядер двух клеток и последующего редукционного деления образуются специализированные гифы с органами полового спороношения – сумками (асками), в которых развиваются аскоспоры у аскомицетов и базидиями, в которых развиваются базидиоспоры у базидиомицетов.

Грибы, способные к половому размножению называются совершенными, развивающиеся без полового размножения – несовершенные.

К микомицетам относят грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*.

Дрожжи – представители класса *Ascomycetes* – одноклеточные организмы круглой или овальной формы. Размножение дрожжей происходит почкованием или делением.

Особенности микроскопического исследования грибов

Грибы обычно исследуют в неокрашенном состоянии. На предметное стекло наносят каплю жидкости, состоящей из воды, этанола и глицерина в равных объемах. Микологическим крючком берут кусочек мицелия, расправляют препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом $\times 40$ при затемненном поле зрения.

Работа 1.

Задание. Приготовить препараты из культур грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжей.

Работа 2.

Задание. Изучить под микроскопом строение мицелия, морфологию органов плодоношения и спор, заполнить таблицу.

Таблица

| Исследуемый материал | Метод приготовления препаратов | Результат (рисунок с обозначениями) |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |

Контрольные вопросы: 1. Каковы характерные особенности микроскопических грибов? 2. В чем характерное отличие высших и низших грибов? 3. В чем характерные особенности грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжей?

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Действие физических и химических факторов на микроорганизмы. Стерилизация. Методы стерилизации»

2.4.1 Цель работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.4.2 Задачи работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Шпатели Дригальского, петли, крючки, стеклянные пипетки, колбы, пробирки, чашки Петри, вата, марля, пергаментная бумага, нитки, ножницы, сухожаровой шкаф, автоклав

2.4.4 Описание (ход) работы:

Стерилизация (лат. *sterilis* — бесплодный) — обезспложивание; уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах. Для стерилизации используют физические и химические методы.

Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью физических средств. К ним относят: стерилизацию сухим жаром, влажным жаром, фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком.

Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Различают термическую и холодную стерилизацию. Существуют следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. К методам холодной стерилизации относят стерилизацию фильтрованием (пропускание жидкостей через специальные мелкопористые фильтры, называемые бактериальными), ультрафиолетовыми лучами, ионизирующими излучением, растворами и газообразными средствами. Дробная стерилизация применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температур выше 100°C, она заключается в многократном прогревании сред без избыточного давления. Пастеризация - однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C (15-30 минут при 60-70 °C, 10-15 минут при 80°C).

Для стерилизации посуды обычно используются сухожаровые шкафы, а для стерилизации питательных сред автоклавы, которые отличаются объемом внутренней камеры и способом загрузки (вертикальная и горизонтальная). Современное оборудование может работать в автоматическом режиме и снабжено микропроцессорным управлением.

Химические методы стерилизации. Сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром (для освобождения от консерванта среду нагревают до 56 °C). Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25...0,5%-м раствором фенола, 0,5%-м раствором хлороформа, 0,5%-м раствором формалина или раствором мертиолата (в конечном разведении 1 : 5000 - 1:10 000).

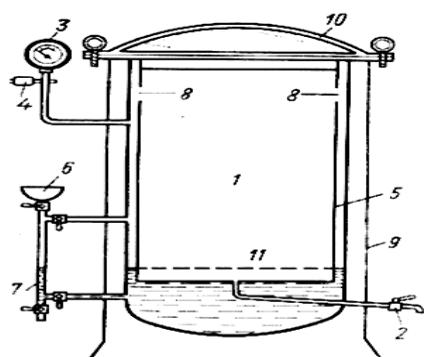
Работа 1.

Задание

1. Познакомиться с устройством и принципом работы автоклава (рис. 6).

Рис. 6. Схема автоклава

1. стерилизационная камера; 2. кран для выхода воздуха; 3. манометр; 4. предохранительный клапан; 5. водопаровая камера; 6. воронка для заполнения автоклава водой; 7. водомерная трубка; 8. отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 9. защитный кожух; 10. крышка автоклава; 11. подставка для размещения посуды.



Работа 2.

Задание. Подготовить для стерилизации пробирки и колбы с ватно-марлевыми пробками. Для приготовления пробок плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатать валиком, обернуть марлевой салфеткой. Длина обычной пробки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5-2 см. Для сохранения формы, пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Перед стерилизацией пробки прикрыть бумажными колпачками.

Работа 3.

Задание. Простерилизовать подготовленную посуду и инструменты в сухожаровом шкафу при 160°C 2 часа. По окончании стерилизации шкаф на открывать до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении может нарушиться стерильность материала, а сильно нагретое стекло может потрескаться.

Контрольные вопросы: 1. Стерилизация питательных сред. 2. Подготовка сред к стерилизации. 3. Методы стерилизации питательных сред. 4. Устройство и принцип работы автоклава. 5. Выбор режима автоклавирования в зависимости от состава и pH среды, от объема стерилизуемого субстрата, от толщины стенок и формы емкостей. 6. Дроб-ная стерилизация. 7. Пастеризация. 8. Стерилизация фильтрованием. 9. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Разнообразие питательных сред. Культивирование и методы учета численности микроорганизмов.»

2.5.1 Цель работы: Изучить разнообразие питательных сред.

2.5.2 Задачи работы:

1. Изучить разнообразие питательных сред.

2. Изучить правила приготовления питательных сред.

3. Изучить прямые и косвенные методы учёта численности микроорганизмов.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильные биологические пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стеклянные емкости для приготовления питательных сред, компоненты питательных сред: пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, овсяная мука (или хлопья), сахароза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, KCl , FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, агар, дистиллированная вода, технические и аналитические весы, водяная баня, потенциометр, спиртовки

2.5.4 Описание (ход) работы:

Питательные среды

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма.

Требования, предъявляемые к средам. Среды должны соответствовать следующим условиям: 1) быть питательными, то есть должны содержать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки - источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы, факторы роста (витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать); 2). иметь оптимальную концентрацию водородных ионов (pH), так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества; 3). быть изотоничными для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида; 4). быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микробы, определению его свойств и изменяют свойства среды; 5). плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию; 6). Обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов; 7) быть по возможности унифицированными, т.е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

По консистенции среды бывают жидкые (мясо-пептонный бульон), полужидкие и плотные (мясо-пептонный агар). Основу многих питательных сред составляет мясная вода, которую готовят из свежего нежирного говяжьего мяса. Для приготовления плотных сред к мясной воде прибавляют 1,5- 2,5% агар-агара (полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей) или 10-15% желатина, которые используются для уплотнения среды. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1- 0,2% агара.

По составу среды делят на простые и сложные. К первым относят мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь (кровяной агар), сыворотку (сывороточный агар), углеводы и другие вещества, необходимые для роста и размножения того или иного микроорганизма.

По составу среды для культивирования делят также на три группы: естественные или натуральные, синтетические и полусинтетические. Натуральные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. К ним относят: овощные и фруктовые соки, животные ткани, молоко, молочную сыворотку, пивное сусло, мелассу, отвары и экстракты, полученные из природных субстратов. Эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и используются, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, солодовое (неохмеленное пивное) сусло, дрожжевые среды, обезжиренное молоко и т. д.

В состав синтетических сред входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. В большинстве случаев их готовят на водопроводной воде без добавления микроэлементов, так как они в небольших количествах всегда в ней содержатся. При изучении потребностей микроорганизмов в отдельных компонентах минеральных солей для приготовления синтетических сред используют дистиллированную воду. В этом случае микроэлементы вносят в среду обязательно. Синтетические среды используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Среды, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы (углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и т. д.) входят вещества неопределенного состава (дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, меласса, гидрол, молочная сыворотка, барда и т. д.), относят к полусинтетическим. Эти среды обычно используются в биотехнологии для промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По назначению различают универсальные среды, содержащие питательные вещества, в присутствии которых растут многие виды микроорганизмов (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар); специальные среды, которые применяют для выращивания микроорганизмов, не размножающихся на универсальных средах; элективные, дифференциально-диагностические, накопительные, оптимальные среды. Элективные среды служат для выделения определенного вида микроорганизмов, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Жидкие элективные среды называют средами накопления. Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других по ферментативной активности, например, среды Гисса с углеводами и индикатором. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида. Примером индикаторной среды для выявления бактерий семейства из группы кишечной палочки является агариевая среда Эндо, которая содержит лактозу и фуксин, обесцвеченный сульфатом натрия, *E.coli* ферментирует лактозу, фуксин освобождается и окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет.

Накопительные среды были предложены голландским ученым М. Бейеринком. В них интересующий исследователя компонент среды дается в избытке, чтобы выяснить, какой микроорганизм или группа микроорганизмов его используют, поскольку именно он или они будут доминировать в этой среде.

Оптимальные среды предложил А.А. Имшенецкий для целлюлозоразрушающих микроорганизмов, В.С. Буткевич – для продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger*. Основной принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий для выбранных микроорганизмов внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, ростовых веществ, микроэлементов).

Каждый сосуд со средой должен иметь этикетку с обозначением названия среды и времени ее приготовления.

Работа 1.

Задание.

1. Приготовить натуральную агариованную среду для культивирования актиномицетов следующего состава (г / л): овсяная мука (или хлопья) -20,0; агар- 20,0; pH 7,0- 7,2. Для приготовления среды овсяную муку (или хлопья) варят в 1 л водопроводной воды 20 мин, фильтруют и доводят объем до 1л.

2. Приготовить синтетическую среду Чапека-Докса для культивирования мицелиальных грибов следующего состава (г / л): сахароза- 30, 0; NaNO_3 – 3,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl - 0,5; $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01; агар- 15,0; вода дистиллированная-1000мл; pH 6,0.

3. Разлить среды в стеклянные емкости не более чем на половину их высоты, закрыть ватными пробками и отдать на стерилизацию.

4. Готовую стерильную агариованную среду расплавить на кипящей водяной бане. Разлить ее в асептических условиях в чашки Петри по 20- 25 мл и в биологические пробирки не более чем на 1/ 3 их высоты. Пробирки установить в наклонном положении так, чтобы среда не доходила до ватной пробки на 4-6 см.

Работа 2.

Задание. Изучить виды питательных сред для культивирования микроорганизмов. Заполнить таблицу.

Таблица

| Виды питательных сред | Характеристика |
|------------------------------------|----------------|
| 1. элективные или избирательные | |
| 2. дифференциально-диагностические | |
| 3. накопительные | |
| 4. оптимальные | |
| 5. естественные | |
| 6. синтетические | |
| 7. полусинтетические | |
| 8. плотные | |
| 9. жидкие | |

Работа 3.

Задание.

Изучить состав элективных и дифференциально-диагностических сред для культивирования микроорганизмов разных таксономических групп. Используя аннотации к питательным средам, внести в протокол описание сред.

Таблица

| Название среды | Назначение | Вещества, придающие элективные и дифференциально-диагностические свойства |
|----------------|------------|---|
| | | |

Работа 4.

Задание. Изучить особенности роста микроорганизмов разных видов на дифференциально-диагностических средах: среда Эндо, желточно-солевой агар, хламидоспор-агар, кровяной агар. Результаты зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Виды питательных сред и их назначение. 2. Основные требования к питательным средам, используемым для культивирования микроорганизмов. 3. Компоненты питательных сред: источники углерода, источники азота, минеральные соли, микроэлементы, факторы роста, предшественники метаболитов и другие вещества, необходимые для роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов. 4. Сырье, используемое для приготовления питательных сред (меласса, гидрол, барда, кукурузный экстракт, молочная сыворотка и т.д.).

Материалы и оборудование: стерильные биологические пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стеклянные емкости для приготовления питательных сред, компоненты питательных сред: пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, овсяная мука (или хлопья), сахароза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, агар, дистиллированная вода, технические и аналитические весы, водяная баня, потенциометр, спиртовки.

Прямые и косвенные методы учёта численности микроорганизмов

Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом. Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток. Основное ограничение большинства указанных методов — необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов — дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева — Тома.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского—Брида). Метод широко используется для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах — почве, загрязненных водах, молоке, в оптически непрозрачных питательных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, соевую муку. Преимущество метода заключается также в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Этот метод рекомендуется использовать для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других исследованиях. Фильтрование пробы определенного объема позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

При выявлении и количественном учете микроорганизмов широко применяют люминесцентную микроскопию. Препараты микроорганизмов готовят непосредственно из исследуемой суспензии и ее разведений либо концентрируют клетки на специально обработанных не флуоресцирующих фильтрах. Препараты и фильтры с микроорганизмами обрабатывают акридином оранжевым или другими красителями. Принципы подсчета при люминесцентной и светлопольной микроскопии одинаковы, однако окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата и хорошо отличимы от небиологических объектов.

При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма

необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Косвенные методы определения численности микроорганизмов основаны на измерении величины параметров, значения которых зависят от количества микроорганизмов: биомасса, светорассеяние, подсчёт колониеобразующих единиц (метод Кхоя).

Метод измерения светорассеяния. Количество света, рассеиваемого супензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной супензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Таракасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы — $0,93 \cdot 10^9$ кл/мл; коклюшной группы — $11 \cdot 10^9$ кл/мл; для бруцеллезных бактерий — $1,7 \cdot 10^9$ кл/мл; туляремийных микробов — $5 \cdot 10^9$ кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1-0,5 мл исследуемой бактериальной супензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандарта мутности». К супензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную супензию, чтобы уравнять ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной супензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл супензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой супензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную супензию развели в 10 раз. Известно, что супензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой супензии составляет $1,3 \cdot 10^{10}$ кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандарта мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в супензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на принципе Кхоя, что бактериальная колония — это результат деления единичной клетки на плотной питательной среде (исключение составляют бактерии, образующие цепочки из клеток). Метод включает три этапа: приготовление разведения, посев на плотные питательные среды определенного объема бактериальной взвеси, учет количества колоний, выросших после инкубации на плотной питательной среде.

Определение биомассы взвешиванием. Этот метод широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидких питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в супензию. Метод не может

быть использован при культивировании микроорганизмов на средах, в состав которых входят соединения, не растворимые в воде.

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций: доведения массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определения их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения. Фильтры помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1—2 ч при температуре 80—85° и 90—100°. Затем фильтры вынимают и переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaСl) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры, от 5 до 10 мл. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранных фильтров должны быть меньше величины клеток, биомассу которых определяют. Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, колбу подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной дистиллированной водой. Подробно порядок работы с мембранными фильтрами.

Определение биомассы. Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, который использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле:

$$M = (A - B) * 1000 / V,$$

где M — сухая биомасса в г/л; A — масса центрифужной пробирки (фильтра) с осадком в г; B — масса центрифужной пробирки (фильтра) без осадка в г; V — объем культуральной жидкости, взятый для центрифугирования (фильтрования) в мл. Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

Работа

Задание. Определить количество микроорганизмов в бактериальной суспензии методом Коха.

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры *E. coli* в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °C (разведение 10-1). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от 10^{-2} до 10^{-8} . Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл наносят на поверхность подсущенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °C 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10... 150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени

разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

Контрольные вопросы: 1. Определение количества жизнеспособных микроорганизмов методом Коха. 2. Определение количества микроорганизмов с помощью стандарта мутности. 3. Использование показателя светорассеивания для определения численности микроорганизмов.

2.6 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Выделение чистой культуры микроорганизмов»

2.6.1 Цель работы: Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов.

2.6.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов.

2. Изучить условия культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.

3. Ознакомиться с питательными средами для культивирования анаэробов.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри со стерильными плотными питательными средами, пробирки со стерильным МПА, МПБ, бактериологические петли, спиртовки

2.6.4 Описание (ход) работы:

При изучении свойств микроорганизмов, для получения биомассы необходимо размножать и выращивать их в условиях лаборатории. Культивирование, или выращивание, микроорганизмов возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Большинство бактерий, дрожжи, плесени и часть простейших культивируются на искусственных питательных средах. Вирусы, риккетсии и некоторые простейшие способны размножаться только в живых клетках, культуре тканей, курином эмбрионе или в организме животного.

Искусственные питательные среды, применяющиеся для культивирования микроорганизмов, должны содержать все питательные вещества — белки, жиры, углеводы; вещества, необходимые для роста и размножения микробов. Источниками азота могут быть различные неорганические и органические соединения, источником углерода — углеводы, спирты, определенные кислоты. Для культивирования некоторых микроорганизмов необходимо добавление жиров, парафина, воска. Большинство гетеротрофов, особенно патогенных, культивируют в средах, содержащих кровь, сыворотку, сложные органические вещества, витамины, ионы металлов.

Питательные среды должны содержать также достаточное количество воды, быть по возможности прозрачными обязательно стерильными, т. е. до посева в них не должны находиться микроорганизмы.

Температура выращивания должна быть оптимальной для данного вида микроорганизмов. Большинство возбудителей инфекционных заболеваний размножается при 37°C. Однако для отдельных видов оптимальная температура культивирования несколько ниже: для возбудителя чумы 28°C, для спирохет и некоторых простейших — лейшманий 28—29°C. Грибы можно выращивать и при более низких температурах. Выращивание микроорганизмов на питательных средах производят в специальных аппаратах — термостатах, в которых и поддерживают оптимальную температуру.

Чистой культурой называют популяцию бактерий одного вида, выращенную на питательной среде. Культуры микробов одного вида, выделенные из различных источников — штаммы. Чистые культуры бактерий получают из изолированных колоний. Выделяют микроорганизмы из исследуемого материала путем посева на плотные или жидкие питательные среды с помощью микробиологической петли или шпателя. Выделение неприхотливых бактерий проводят на простых средах, прихотливых видов — на

средах с дополнительными питательными веществами. Колония - изолированное скопление бактерий одного вида, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной бактериальной клетки. Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету. Для получения изолированных колоний на практике наиболее часто используют модификацию рассева по Дригальскому: материал наносят на поверхность плотной питательной среды ближе к краю и делают «бляшку», затем из неё материал распределяют по четырём квадратам, проводя петлёй штрихи, обжигая петлю после засева каждого квадрата.

Температура культивирования. Патогенные бактерии вариабельны в отношении температур, оптимальных для их роста, но большинство из них мезофиллы, исключение составляют некоторые атипичные микобактерии, возбудители чумы, листерии и лептоспирсы (t - 20-30 °C), а также *Campylobacter jejuni* (t - 42 °C). **Состав газовой среды.** Бактерии чётко разделяют по отношению к содержанию кислорода в атмосфере культивирования. Аэробы. Посевы аэробных бактерий культивируют в термостатах. Некоторые факультативно анаэробные виды можно культивировать при атмосферном воздухе, но оптимально помещение посевов в эксикаторы, куда вносят горящую свечу; после её выгорания в атмосфере снижается содержание кислорода и повышается содержание CO₂. **Методы культивирования.** При выращивании бактерий применяют стационарный способ, способ глубинного культивирования с аэрацией и метод проточных питательных сред. Стационарный способ — состав сред остается постоянным, микроорганизмы выращиваются на поверхности плотной или в тонком слое жидкой среды, и кислород поступает к ним непосредственно из воздуха.

Работа 1

Задание. Осуществить культивирование аэробных микроорганизмов в термостате.

На чистую чашку Петри с плотной питательной средой осуществить посев исследуемого материала, чашку с посевом убрать в термостат.

Контрольные вопросы: 1. Условия культивирования аэробных микроорганизмов. 2. Понятия «колония», «штамм», «чистая культура», «посев», «рассев».

Материалы и оборудование: стерильные биологические пробирки с ватными пробками, засеянные культурой микроорганизмов, стерильные чашки Петри с МПА, бактериологические петли, термостат, спиртовки.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо создание бескислородных условий, достигаемое различными методами.

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах - анаэростатах. Иногда воздух в них заменяют каким-либо другим газом, например CO₂. Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробов в глубине столбика сахарного агара или среды Вильсона — Блера, налитых в пробирки в расплавленном состоянии и остуженных до 43°C. По методу Вейона-Виньяля расплавленный и остуженный агар с посевным материалом набирают в стеклянные трубочки, которые запаивают с двух концов.

Химические методы заключаются в том, что при культивировании исследуемого материала на плотных средах в эксикатор помещают химические вещества, например пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода. В жидкие питательные среды можно добавлять различные редуцирующие вещества: аскорбиновую или тиогликолевую кислоту.

Биологический метод основан на одновременном культивировании аэробов и анаэробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закупоренных. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, посевными на одной половине среды, а затем начинается рост анаэробов, посев которых сделан на другой половине. Наиболее удобна для культивирования анаэробов специальная среда Кита-Тароцци. В нее входят сахарный МПБ, который наливают в пробирки в количестве 10-12 мл, и кусочки вареных паренхиматозных органов. Перед употреблением среду Кита-Тароцци кипятят на

водяной бане для удаления растворенного в ней кислорода. Среду заливают сверху стерильным вазелиновым маслом. Заметный рост анаэробов (помутнение) может наблюдаться через 48 ч и более в зависимости от количества посевного материала.

Рост изолированных колоний анаэробов можно получить при рассеве исследуемого материала по поверхности кровяно-сахарного агара, разлитого в чашки Петри. После посева чашки помещают в анаэростат. Исследуемый материал в убывающей концентрации можно засевать в высокий столбик агара. Образовавшиеся отдельные колонии анаэробов выделяют, распилив пробирку в месте роста. Колонии анаэробов для получения значительного количества биомассы отсевают затем на среду Кита-Тароцци. В качестве источника энергии для анаэробов используют глюкозу, добавление которой в питательную среду обязательно.

При культивировании анаэробов посевы исследуемого материала выращивают на специальных средах в анаэробных условиях, исключающих доступ к ним свободного кислорода. Питательные среды, используемые для культивирования анаэробов: Шедлер-агар, Шедлер-бульон. Среда Кита-Тароции – питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных, которые обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла. Среда контроля стерильности (СКС) – 0,3% агар с добавлением тиогликолевой кислоты (редуцент кислорода), посев уколом. Среда Вильсона – Блер – высокий столбик питательного агара с добавлением солей натрия и железа, посев уколом. Анаэробы образуют черные колонии в глубине столбика за счет химической реакции с солями металлов.

Анаэробиоз создают, используя анаэростат или эксикатор. Анаэростат представляет собой толстостенную металлическую емкость, куда помещают чашки Петри или пробирки с засеянными микроорганизмами. Система газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и замерять давление. Современные анаэростаты представляют собой пластиковую емкость с плотно притертой крышкой, в которую для удаления воздуха помещают газорегенераторные пакеты. Эксикатор – толстостенная стеклянная емкость с притертой крышкой и подставкой для чашек Петри. На дно эксикатора ставится горящая свеча либо наливается тиогликолевая кислота (химический редуцент кислорода), затем крышка притирается.

Работа 2

Задание. Приготовить специальные среды для культивирования анаэробов.

Вильсона-Блера среда – железосульфитный агар для выделения анаэробов. К 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 80°C щелочного 3% МПА доливают 10 мл 20% свежеприготовленного стерильного р-ра натрия сульфита и 1 мл 8% р-ра железа хлорида, приготовленного на стерильной воде. Среду разливают в пробирки высоким столбиком и без стерилизации ставят в термостат при 37°C на сутки для проверки стерильности. Материал засевают уколом в столбик или в расплавленную и охлажденную среду. Патогенные и условно-патогенные анаэробы образуют в среде колонии черного цвета или дают сплошное почернение среды.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием. В пробирки или флаконы, предназначенные для среды Тароцци, добавляют на дно щепотку углекислого кальция, стерилизуют горячим воздухом по ГОСТ 26668-85, закладывают в них кусочки мяса или печени и заливают мясо-пептонным бульоном с глюкозой, приготавливая среду. Применяют для анаэробных микроорганизмов, для посева кислотных консервированных продуктов.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием, дрожжевым экстрактом и аскорбиновой кислотой.

Готовят среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием, но в мясо-пептонный бульон перед фасовкой вносят 2 г дрожжевого экстракта или 10 см³ раствора дрожжевого экстракта. Перед анализом в регенерированную среду Китт-Тароцци с углекислым

кальцием и дрожжевым экстрактом асептически вносят аскорбиновую кислоту из расчета 100 мкг на 1 дм³ среды. Применяют для мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов. Для внесения аскорбиновой кислоты в среду раствор разводят в стерильной дистиллированной воде в 100 раз и 0,2 см³ приготовленного раствора вносят на 1 дм³ среды.

Работа 3.

Задание: проанализировать различные методы создания анаэробных условий. Заполнить таблицу.

Таблица

Методы создания анаэробных условий

| Метод, среда | Условия создания анаэробиоза |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Физический | |
| Химический | |
| Биологический | |
| Специальные среды: Китта-Тароцци | |
| Вильсона-Блер | |
| СКС (среда контроля стерильности) | |

Контрольные вопросы: 1. Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий. 2. Состав элективных питательных сред для анаэробных бактерий.

2.7Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистой культуры»

2.7.1 Цель работы: Изучить особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

2.7.2 Задачи работы:

Изучить особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Чашки Петри с изолированными колониями бактерий, линейки, петли, спиртовки

2.7.4 Описание (ход) работы:

Изучение морфологии колоний бактерий и дрожжей

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха и сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. При описании колоний отмечают следующие её признаки: форму, величину, цвет, поверхность, профиль, край, консистенцию.

По форме колонии бывают округлые, амёбовидные, неправильные, ризоидные и т.д. (рис. 7).

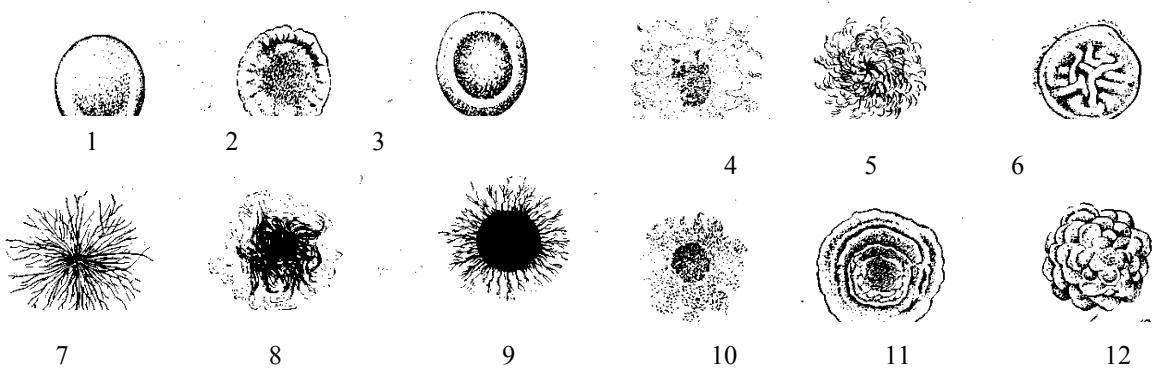


Рис. 7. Форма колоний: 1- круглая; 2- круглая с фестончатым краем; 3- круглая с валиком по краю; 4, 5- ризоидные; 6- с ризоидным краем; 7- амебовидная; 8- нитевидная; 9- складчатая; 10- неправильная; 11- концентрическая; 12- сложная, конусовидным и т. д. (рис. 8).

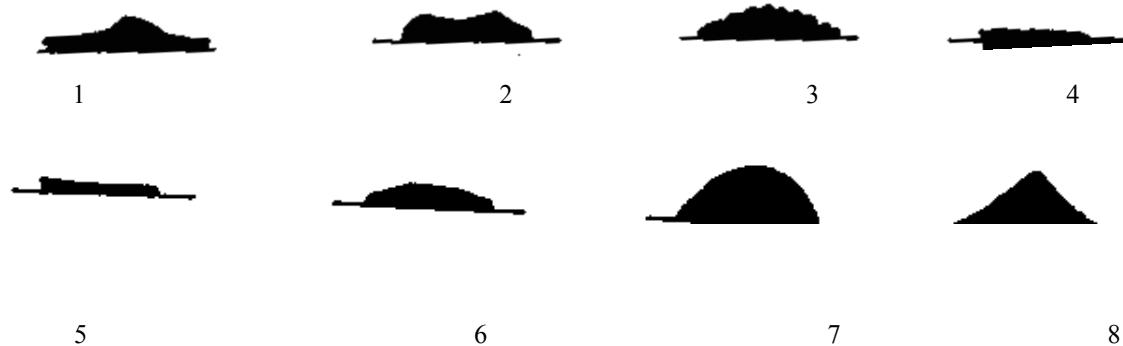


Рис. 8. Профиль колонии: 1- изогнутий; 2- кратерообразный; 3- бугристый; 4- врастаящий в субстрат; 5- плоский; 6- выпуклый; 7- каплевидный; 8- конусовидный.

Структура колонии может быть однородной, мелкозернистой, крупнозернистой и т.д (рис. 9).

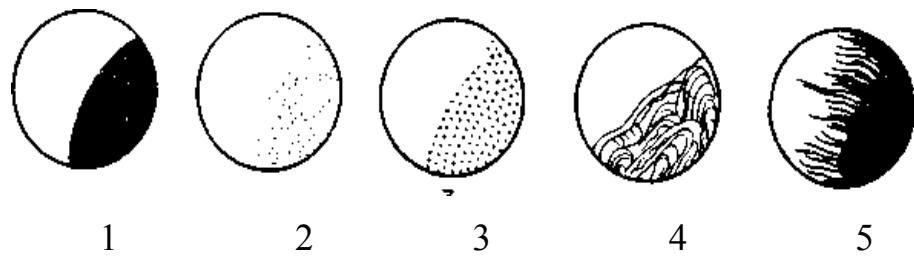


Рис. 9. Структура колонии: 1- однородная; 2- мелкозернистая; 3- крупнозернистая; 4- струйчатая; 5- волокнистая.

Характер края колонии определяют при рассмотрении её под лупой или под микроскопом при малом увеличении. Он может быть ровным, волнистым, зубчатым, бахромчатым и т.д. (рис.10).

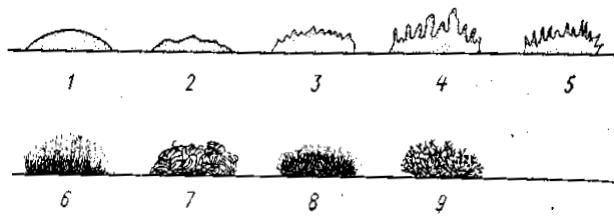


Рис. 10. Край колонии: 1- гладкий; 2- волнистый; 3- зубчатый; 4- лопастной; 5- неправильный; 6- реснитчатый; 7- нитчатый; 8- ворсинчатый; 9- ветвистый.

Величина колонии определяется её диаметром в мм. Мелкие колонии имеют диаметр 1-2 мм, средние 2-4 мм, крупные – более 4 мм. Колонии менее 1 мм в диаметре называют точечными. Размер (диаметр) колонии измеряют с помощью обычной линейки или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа. Чашки при этом помещают на столик микроскопа крышками вниз.

Цвет колонии зависит от выработки определённого пигмента. Например, колонии бактерий *Xanthomonas campestris* обычно имеют желтый цвет благодаря образованию пигментов «ксантомонадинов», которые имеют уникальное строение и представляют собой бромзамещенные арильные полиены. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат.

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает гладкой, шероховатой, складчатой, морщинистой, с концентрическими кругами и т. д.

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к её поверхности пальцем. По консистенции различают следующие колонии:

- пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды, наподобие сливочного масла;
- вязкие или слизистые, снимающиеся и тянувшиеся за пальцем;
- волокнистые, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки;
- хрупкие, сухие, распадающиеся от прикосновения пальцев.

Колонии продуцентов ксантана обычно окружные, 3-4 мм в диаметре, гладкие, маслянистые или клейкие, выпуклые с четко очерченным ровным краем, желтого цвета. Морфология колоний в значительной степени зависит от используемого штамма и среды культивирования.

Колонии актиномицетов часто имеют более сложную форму, мучнистую или бархатистую поверхность и волокнистую консистенцию.

Колонии дрожжей на первый взгляд мало отличаются от бактериальных: они не опущены воздушным мицелием как у актиномицетов и грибов и чаще всего бывают гладкими, густыми и плотными или реже – слизистыми, растекающимися. По цвету они могут быть чисто- белыми, буровато- бежевыми, коричневыми или яркими, окрашенными во все тона желто- оранжево- красного цвета. Колонии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* пастообразные, кремовые или коричневато- кремовые, обычно с довольно ровной, гладкой, иногда пузырчатой поверхностью, край колоний ровный, иногда лопастной. Форма колоний дрожжей может быть различной.

Работа

Задание. Отобрать 2-3 изолированных колонии, описать их и зарисовать. Результаты занести в следующую таблицу:

Таблица

Морфология колоний исследуемых бактерий и грибов

| № | Форма | диаметр, мм | ветвь | Поверхность | Профиль | рай | Структура | Консистенция | Рисунок |
|---|-------|-------------|-------|-------------|---------|-----|-----------|--------------|---------|
| 3 | | | | | | | | | |

Контрольные вопросы: 1. Признаки, используемые для описания колоний бактерий. 1.1.Форма колоний. 1.2.Профиль колоний. 1.3.Структура колонии. 1.4.Край колонии. 1.5.Поверхность колонии. 1.6.Консистенция колоний.

Материалы и оборудование: чашки Петри с изолированными колониями бактерий, линейки, микроскопы, петли, спиртовки.

Изучение характера роста микроорганизмов в жидкой среде

Микроорганизмы при росте в жидких средах могут вызывать помутнение среды, образование пленок или осадка. Обычно указывают степень помутнения среды — слабая, умеренная или сильная. Мутнота среды может быть постоянной или временной, однородной, хлопьевидной, с шелковистой волнистостью и т. д. Если образуется пленка, то отмечают ее характер — тонкая, плотная или рыхлая, гладкая, морщинистая или складчатая. При образовании осадка следует отметить его количество (скучный, обильный и т. д.) и консистенцию (плотный, рыхлый, слизистый). Отмечают возраст культуры, состав среды, условия культивирования. В ряде случаев рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, изменением цвета среды, газообразованием. Чтобы установить способность микроорганизмов к газообразованию, в пробирку помещают так называемый «поплавок» — маленькую, запаянную с одного конца трубку. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды, и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. Если рост микроорганизмов сопровождается газообразованием, то образующиеся газы скапливаются в поплавке в виде пузырька.

Рост мицелиальных грибов в глубинной культуре происходит в виде мицелиальных агломератов или «шариков» более или менее правильной округлой формы, гладких или пушистых, плотных или полых. Может наблюдаться также дисперсный рост в виде отдельных гиф.

Для актиномицетов характерны два типа роста в условиях глубинного культивирования: хлопьевидный (рыхлые колонии с торчащими во все стороны гифами) и зернистый (несвязанные микроколонии в виде уплотненных шариков).

Работа 1.

Задание. Описать характер роста в жидкой среде бактерий, актиномицетов, дрожжей и мицелиальных грибов.

Контрольные вопросы: 1. Характер роста бактерий и дрожжей в жидкой питательной среде. 2. Характер роста актиномицетов и мицелиальных грибов в жидкой питательной среде.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам»

2.8.1 Цель работы: Проверить знания и практические навыки по морфологии микроорганизмов.

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ»

2.9.1 Цель работы: Изучить возбудителей масляно-кислого брожения и брожения пектиновых веществ.

2.9.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Льняная солома, пробирки, ножницы, водяная баня, раствор Люголя, 5%-ный раствор FeCl_3 , пипетки, пинцеты, скальпели, предметные и покровные стекла, микроскопы

2.9.3 Описание (ход) работы:

Возбудителями **маслянокислого брожения** являются строгие анаэробы, подвижные палочки с клостридиальным или плектридиальным типом спорообразования. По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяют на истинно маслянокислое (брожение глюкозы, крахмала), ацетонобутиловое брожение, брожение пектиновых веществ.

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



Кроме масляной в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при подкислении среды (до $\text{pH} 5,5$) – значительные количества бутилового спирта и ацетона.

Работа 1.

Задание. Изучить маслянокислое брожение.

Маслянокислое брожение крахмала исследуют на среде с картофелем. В среду не вносят ни почвы, ни маслянокислых бактерий, так как на кожуре картофеля всегда есть их споры. Элективные условия создают наличием крахмала – источника углерода, используемого только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу; пастеризацией; анаэробиозом (высокий столбик жидкости в пробирке и выделение в процессе брожения CO_2 и H_2 , вытесняющих воздух).

Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водопроводной водой на 2/3 и помещают на водяную баню при 80°C на 10 мин для пастеризации. Через 2-3 дня картофель всплывает вследствие бурно идущего газообразования. По окончании брожения культуральную жидкость используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

Микрокопирование маслянокислых бактерий. Питательную среду из пробирки с картофелем отбирают пипеткой, закрыв указательным пальцем верхний конец и погрузив ее кончик в средний слой сброшенной жидкости. Слегка приподняв палец, набирают в пипетку жидкость, снова зажимают пальцем верхний конец пипетки и, вынув ее из колбы, наносят каплю на предметное стекло. К накопительной культуре добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом, на которое наносят каплю кедрового масла. При микрокопировании препарата обнаруживаются клетки *Clostridium butyricum* (от лат. *close* – закрыть, *clostrum* – замок, *iridium* – надолго, долгоживущие, поскольку имеют спору и жизненном цикле; от греч. *butyrum* – масло), *C. pasteurianum* и других бактерий, имеющих подобную форму (рис. 14). В клетках можно заметить овальные тельца, сильно преломляющие свет. Это споры. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает сине-фиолетовое окрашивание. Зарисовывают только окрашенные клетки, явно относящиеся к группе маслянокислых бактерий.

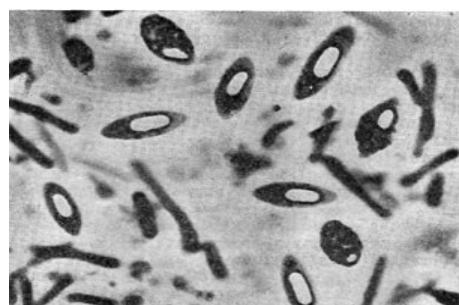
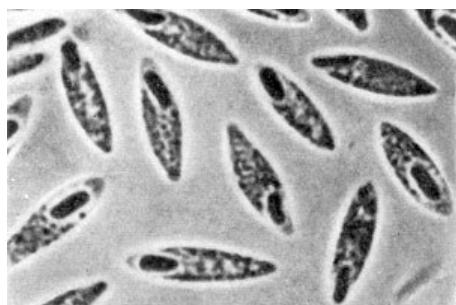


Рис. 14 *C. butylicum*

C. pasteurianum

Качественные реакции на масляную кислоту. Получение масляно-кислого железа (реакция с $FeCl_3$). Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с $FeCl_3$ приобретают коричневое окрашивание вследствие образования маслянокислого железа.

В пробирку наливают 3-5 мл сброженной жидкости, добавляют 1-2 мл 5%-ного хлорида железа и нагревают на пламени. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буровато-коричневый цвет, а в проходящем свете - кроваво-красный.

Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции). К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавляют 0,5 мл 96%-ного этилового спирта и 1-2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса).

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать возбудителей масляно-кислого брожения. 2. Значение масляно-кислого брожения в народном хозяйстве.

Материалы и оборудование. Картофель, мел, пробирки, пипетки, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5%-ный раствор $FeCl_3$, предметные и покровные стекла, микроскопы.

Работа 2.

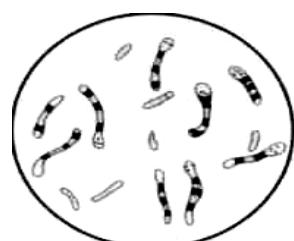
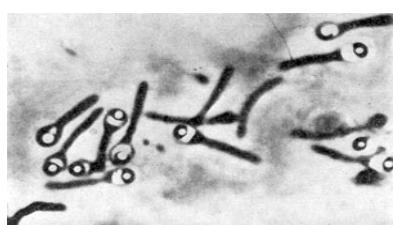
Задание. Изучить брожение пектиновых веществ.

Снопик льняной соломы высотой 6-7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в крупную пробирку, наполненную на 2/3 водопроводной водой. Пробирку, зажав пинцетом, кипятят на горелке 2-3 мин для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Воду сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Эту операцию осуществить 5-6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном, и в снопик вводят свежую соломину, не подвергавшуюся нагреванию.

Пробирку со снопиком помещают в термостат при 30-35 °C. Через 2-3 дня начнется брожение, а через 5-8 сут. оно закончится. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, образующейся при сбраживании продуктов гидролиза пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций на масляную кислоту.

Микроскопирование. Извлекают снопик из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и отжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате - крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum* (рис. 15). Нередко обнаруживается *C. felsineum* - палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки.



Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать возбудителей брожения пектиновых веществ.

2.10 Лабораторное занятие №10 (2 часа)

Тема: «Экспериментальное заражение лабораторных животных. Определение вирулентности и факторов патогенности микроорганизмов. Правила вскрытия и бактериологического исследования трупов лабораторных животных»

2.10.1 Цель работы: 1. Изучить методы заражения лабораторных животных. 2. Ознакомиться с методами определения факторов патогенности микроорганизмов.

2.10.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с кровяным агаром, пробирки с плазмой крови, бактериологические петли, термостат, микробные культуры, лабораторные животные, клетки для животных, шприцы инсулиновые, спиртовые тампоны, кюветы, горелки спиртовые, ватики, пинцеты, корзанги, фарфоровые ступки

2.10.3 Описание (ход) работы:

Определение вирулентности и токсигенности микроорганизмов

В повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности микроорганизма; при оценке биопрепаратов необходимы количественные характеристики вирулентности микроорганизма, взятого для заражения животного.

Вирулентность (токсигенность) микробы измеряют в специальных условных единицах: абсолютная летальная доза (D_{el} — dosis certae letalis) вызывает гибель 100 % зараженных животных; 50%-я летальная доза (LD₅₀) — 50 % зараженных животных; 50%-я инфицирующая доза (ID₅₀) вызывает заболевание 50% зараженных животных. LD₅₀ и ID₅₀ — наиболее точные показатели, поскольку отражают чувствительность к возбудителю (токсину) большинства взятых в опыт животных, а D_{el} показывает чувствительность наиболее устойчивых особей.

Для расчета LD₅₀ исследуемой культуры микроорганизма используют один из приведенных методов. Готовят суспензию бактерий с известным содержанием микробных клеток в единице объема. Затем делают последовательные (2, 5, 10-кратные) разведения суспензии на стерильном физиологическом растворе и равные объемы каждого разведения вводят (подкожно, внутрибрю-шинно и т. д.) чувствительным лабораторным животным. Если определяют летальный эффект, то учитывают количество погибших животных и рассчитывают LD₅₀. Поскольку обычно ни одна из доз возбудителя не приводит к гибели строго 50 % зараженных животных, LD₅₀ определяют статистическими методами.

Биологический метод исследования

Методы исследования, связанные с заражением животных, называются биологическим или биопробой. Используемые для этой цели животные называются лабораторными или экспериментальными. Наиболее широко используют кроликов, морских свинок, белых мышей, крыс, голубей, цыплят.

Экспериментальное заражение лабораторных животных проводится с разной целью: определение патогенности и вирулентности микробов, токсичности и токсигенности их, выделение чистой культуры из патматериала, определение активности и безвредности приготовленных вакцин и т.д.

Способы заражения лабораторных животных

В зависимости от цели исследования и предполагаемого возбудителя выбирают восприимчивое лабораторное животное и подбирают способ его заражения.

Взвесь микробной культуры или суспензию из зараженных органов осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы осторожно закрывают комочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезраствором.

Внутрикожный способ применяется редко. Материал вводят тонкой иглой непосредственно в кожу области спины или живота в дозе 0,1-0,2 мл. чаще всего используют для обнаружения некротоксина (у стафилококков, у листерий и др.).

Подкожный способ заражения применяется при многих заболеваниях. Кожу животного захватывают пальцами и образовавшуюся складку прокалывают иглой шприца, материал вводят медленно. Затем опускают складку, на иглу накладывают вату, смоченную дезраствором и быстро извлекают иглу. Наиболее часто подкожно заражают в область спины, крестца и живота. Доза в зависимости от вида микробы.

Внутримышечный способ – материал вводят в толщу мускулатуры обычно в области бедра, а птицам в грудную мышцу.

Внутрибрюшинный способ применяется часто. Животное фиксируют головой вниз, чтобы внутренние органы опустились к диафрагме. Материал вводят в задней части живота и прокалывают ее под острым углом, затем, повернув шприц под прямым углом, толчком прокалывают брюшную стенку при этом ощущается как бы провал иглы в полость живота.

Внутривенное заражение чаще всего проводят для выявления токсинов у микробов (при ботулизме, при энтеротоксемии). Кроликам материал вводят в краевую вену уха. Рукой сдавливают вену ближе у основания уха, вследствие чего вена лучше наполняется. Тонкой иглой прокалывают кожу и вену, иглу вводят по направлению к корню уха. Затем отнимают пальцы, сдавливающие вену, и медленно инъецируют материал. По окончании иглу прижимают ватой, пропитанной дезраствором, и вынимают. Мышам и крысам материал вводят в боковую вену хвоста, курам и голубям в подкрыльцовую вену.

Очень редко используют заражение через дыхательные пути, в пищеварительный тракт и в переднюю камеру глаза. Место введения в организм материала во всех случаях необходимо обработать, чтобы не внести в организм микробы, имеющиеся на коже животного. Для этого выстригают шерсть на месте введения, кожу протирают дезраствором. После введения материала кожу вновь протирают дезраствором.

Всех зараженных животных отмечают краской, сведения о заражении записывают в журнал. Кроликов помещают в клетки, морских свинок и мышей – в металлические биксы, наклеивают этикетки на которых указывают сведения о заражении.

Работа 1.

Задание. Освоить методы заражения белых мышей.

Заключение о патогенности микроорганизма делают как по результатам биопробы (прямое доказательство), так и по ряду признаков, косвенно свидетельствующих о патогенных свойствах выделенного микробы. Наиболее часто применяют следующие тесты.

Тест на плазмокоагулязу. Коагулаза — фермент бактерий (стафилококков), который в сочетании с некоторыми компонентами сыворотки коагулирует плазму. Благодаря коагулазе вокруг стафилококковых поражений образуется фибринозный барьер, облегчающий персистенцию бактерий в тканях, кроме того, отложения фибрина на поверхности бактериальных клеток затрудняют их фагоцитоз.

Тест на гиалуронидазу. Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту и, как следствие, деполимеризующий межклеточное вещество. Рассматривают как фактор инвазивности бактерий. Получение гиалуронового субстрата (из пупочных канатиков) — довольно сложная процедура. На практике удобнее использовать тест декапсуляции бактерий. В качестве субстрата в этом случае берут культуры бактерий, в капсулном веществе которых есть гиалуроновая кислота (*P. multocida* серовар *A*, *S. equi*).

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

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

Тест на лецитиназу. Лецитиназа расщепляет гидролизом лецитин.

Работа 2.

Задание. Определить наличие плазмокоагулязы у культуры *S. aureus*.

Петлю бактериальной массы исследуемой культуры, снятой с поверхности агаровой среды, смешивают с 0,5 мл плазмы крови кролика (человека), не разведенной или разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:4, инкубируют при 37 °C, результаты учитывают через 4 и 24 ч. Положительная реакция — образование сгустка.

Работа 3.

Задание. Определить наличие гемолитической активности у культуры микроорганизмов.

Исследуемую культуру уколом или дробно засевают в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посевы инкубируют при 37°C 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 микробы становится прозрачным за счет лизиса эритроцитов.

Работа 4.

Задание. Определить наличие лецитиназной активности у культуры *B. cereus*.

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

Контрольные вопросы: 1. Какими методами заражают лабораторных животных? 2. Как определяется вирулентность микроорганизмов? 3. Метод выявления гемолитической активности микроорганизмов. 4. Метод выявления плазмокоагулазы. 5. Методы выявления лецитиназы. 6. Факторы вирулентности.

Материалы и оборудование. Культура *E.coli* на МПБ, стерильные шприцы, иглы, ножницы, скальпели, дезраствор, белые мыши, плазма крови кролика, чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, чашки Петри с желточно-солевым агаром, культуры микроорганизмов на скошенном МПА, бактериологические петли, спиртовки, стерильный изотонический раствор хлорид анатрия.

2.11Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Отбор, консервирование, транспортировка и хранение материала для микробиологического исследования»

2.11.1 Цель работы: Изучить классификации антибиотиков.

2.11.2 Задачи работы:

1. Изучить классификации антибиотиков.

2. Рассмотреть осложнения, развивающиеся при антибиотикотерапии.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бумажные диски, пропитанные антибиотиками

2.11.4 Описание (ход) работы:

Антибиотики - химические вещества биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые избирательно тормозят рост и размножение или губительно действуют на микроорганизмы и опухоли.

Антибиотики классифицируют по способу получения, по происхождению, по химической структуре, по механизму antimикробного действия.

По способу получения выделяют:

- биосинтетические антибиотики (природные). В условиях специальных производств культивируют микроорганизмы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе жизнедеятельности.

- полусинтетические антибиотики. Получают путем биосинтеза с последующей химической модификацией (например присоединение радикалов). В результате улучшаются антимикробные и фармакологические свойства препарата.

- синтетические антибиотики (аналоги природных). Имеют структуру природных, но синтезированы химически.

По происхождению выделяют:

растительные (фитонциды), животной природы, микробные (синтезируемые грибами, актиномицетами (80% антибиотиков), бактериями). Первые две группы природных антибиотиков не получили широкого применения в медицине.

Антибиотики оказывают на микробные клетки воздействия, результатом которых может явиться бактерицидный, бактериостатический, бактериолитический, либо антибиотикозависимый эффект.

По механизму действия среди антибиотиков выделяют:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):

– Бета-лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).

Блокируют образование гетерополимерных цепей на внешней поверхности ЦПМ за счет ингибирования пенициллин-связывающих белков (белков-ферментов - транспептидаз), участвующих в образовании поперечных сшивок. Ингибирование ПСБ приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников ПГ и запуску системы аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит бактериолизис.

– Гликопептиды (ванкомицин, клиндамицин).

Блокируют объединение предшественников пептидогликана в гликопептидные цепи, связывая D-аланин. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (мегатерапия);

– Липопептиды формируют каналы в КС при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. В результате происходит деполяризация клеточной мембраны из-за выхода калия, что приводит к гибели бактериальной клетки.

2. Вызывающие повреждение цитоплазматической мембраны

Полиеновые антибиотики обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембраны путем взаимодействия (блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не бактерий;

Полипептидные антибиотики лизируют фосфолипидные компоненты ЦПМ. Только местное применение.

3. Подавляющие белковый синтез

— нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами – (аминогликозиды), с 50S субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной и-РНК (на 30S субъединице рибосом – тетрациклины).

4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот — эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков относящихся к этой группе – рифампицин, ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции (блокирует синтез мРНК).

Осложнения при химиотерапии

Все основные осложнения при химиотерапии можно разделить на 2 группы:

• осложнения терапии со стороны микроорганизма;

- *осложнения со стороны макроорганизма:*
 - *аллергические реакции* Наличие аллергической реакции на один из препаратов той или иной группы, является абсолютным противопоказанием для использования и других препаратов этой группы, так как возможна перекрестная гиперчувствительность;
 - *прямое токсическое (органотоксическое) действие химиопрепаратов* – так, противоопухолевые антибиотики обладают гемато-, гепато- и кардиотоксичностью, а все аминогликозиды – ототоксичностью и нефротоксичностью.
 - *побочное токсическое (органотропные) эффекты* — эти осложнения связаны не с прямым, а опосредованным действием химиопрепаратов на различные системы макроорганизма. Хлорамфеникол (левомицетин) может подавлять синтез белков не только в микробной клетке, но и в клетках костного мозга, вызывая у части больных развитие стойкой лейкопении
 - оценивая влияние антибиотиков на *функциональную активность иммунной системы*, следует помнить, что все антимикробные агенты снижают напряженность иммунитета. Однако, ряд бета-лактамных антибиотиков, например, цефалоспорин 4-го поколения – цефпиром, а также макролиды, фторхинолоны усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а цефтазидим при системном применении и биопарокс – при местном – обладают истинной иммуностимулирующей активностью.
 - *реакции обострения* — применение бактерицидных антибиотиков в первые дни заболевания при общем тяжелом состоянии больного нередко приводит к резкому ухудшению его состояния. Вплоть до развития *инфекционно-токсического шока*. В основе этого явления лежит массовая гибель возбудителей, сопровождающаяся освобождением большого количества эндотоксина и других токсических продуктов распада бактериальных клеток. Такие выраженные реакции обострения чаще развиваются у детей, так как процессы детоксикации у них развиты слабее, чем у взрослых;
 - *развитие дисбактериоза* — нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры – также одно из частых осложнений химиотерапии. Оно чаще возникает на фоне использования антибиотиков широкого спектра действия. Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений дисбиоза является кандидоз полости рта, гениталий или кишечника.

1. Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов

Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов проявляется развитием лекарственной устойчивости.

Контрольные вопросы: 1. Что такое антибиотики? 2. Существующие принципы классификации антибиотиков 3. Осложнения, возникающие при химиотерапии.

2.12 Лабораторное занятие №12 (2 часа)

Тема: «Принципиальная схема микробиологической диагностики инфекционных болезней»

2.12.1 Цель работы: 1. Рассмотреть 1-ый и 2-ой принцип микробиологической диагностики. 2. Изучить методы диагностики инфекционной патологии.

2.12.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы

2.12.3 Описание (ход) работы:

Принципиальная схема микробиологического исследования. Диагностика инфекционных болезней включает в себя комплекс исследований: эпизоотологические, клинические, патологоанатомические, микробиологические. При важности каждого из них и ценности именно комплексного подхода микробиологическое исследование

особенно важно, поскольку с его помощью либо непосредственно обнаруживают этиологический (причинный) агент болезни, либо косвенными специфическими иммунологическими методами доказывают его присутствие.

Микробиологическое исследование в принципе состоит из следующих этапов.

1. Обнаружение возбудителя непосредственно в исследуемом материале без изоляции в виде чистой культуры на питательных средах. На этом этапе применяют разные методы.

Неиммунологические методы включают в себя: а) выявление возбудителя путем микроскопического исследования окрашенных (по Граму и т. д.) мазков-отпечатков из органов и тканей; б) обнаружение при помощи генетических методов (генные зонды, ПЦР) нуклеиновых кислот возбудителя.

Иммунологические методы заключаются в выявлении антигенов возбудителя с помощью различных серологических реакций (РП, РДП, МФА, ИФА, РИГА и т.д.).

2. Обнаружение возбудителя (его токсинов) в биопробе (заражают исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных).

3. Выделение культуры возбудителя из исследуемого материала путем посева на питательные среды.

4. Идентификация выделенной культуры микроорганизмов по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и патогенных свойств. При этом широко используют серологические (РА, РП, РДП, ИФА и т.д.), а в случае необходимости генетические методы идентификации изолированных микроорганизмов.

5. Серологическая (ретроспективная) диагностика заключается в том, что при помощи различных серологических реакций (РА, РСК, ИФА и т. д.) в сыворотке крови исследуемых животных обнаруживают специфические следы пребывания возбудителя — антитела. Серологические реакции наиболее широко применяют при диагностике хронически протекающих бактериозов.

6. Аллергическое исследование в отличие от перечисленных выше методов проводят непосредственно на животных в хозяйстве. При помощи диагностических аллергенов у животных выявляют состояние гиперчувствительности замедленного типа. Аллергическую пробу в основном применяют для иммунологической диагностики хронических бактериозов.

Изложенная схема отражает возможные, но не обязательные направления микробиологических исследований. При каждой конкретной инфекции схему исследования определяют особенности биологии возбудителя и инфекционного процесса.

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать 1-ый принцип лабораторной диагностики. 2. Описать 2-ой принцип лабораторной диагностики. 3. Недостатки микроскопического метода исследования. 4. Экспресс-методы диагностики. 4. Какова схема микробиологического исследования?

2.13 Лабораторное занятие №13(2 часа)

Тема: «Серологические реакции. Оборудование для постановки серологических реакций»

2.13.1 Цель работы: 1. Дать определение серологическим реакциям. 2. Определить цели постановки серологических реакций. 3. Изучить классификацию антигенов и антител, участвующих в серологических реакциях. 4. Познакомить с методикой получения сыворотки крови.

2.13.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы, антигены, сыворотки, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками

2.13.3 Описание (ход) работы:

Серология как раздел иммунологии занимается постановкой и учетом с серологических реакций. Серологические реакции – это реакции между антигенами и антителами, воспроизведенные вне организма.

Цели постановки серологических реакций:

- по известному антигену обнаружить антитела в сыворотке крови;
- по известной сыворотке обнаружить антигены (чаще всего в патматериале или провести идентификацию выделенной культуры);
- провести исследования напряженности иммунитета;
- для проведения ретроспективной диагностики.

Серологические реакции по конечному взаимодействию АГ и АТ подразделяются на типы:

- осадочные;
- лизирующие;
- нейтрализующие.

Фазы протекания осадочных реакций: 1) специфическая невидимая (происходит образование иммунных комплексов АГ-АТ); 2) неспецифическая видимая (иммунные комплексы выпадают в осадок).

Антигены, участвующие в серологических реакциях подразделяются на корпускулярные или клеточные (в их роли выступают целые микробные клетки или эритроциты) и молекулярно-дисперсные или растворимые (в их роли выступают токсины или отдельные части микробных клеток).

Антитела, участвующие в серологических реакциях, подразделяются на следующие виды:

- агглютинины;
- преципитины;
- бактериолизины;
- гемолизины;
- нейтрализующие.

Одним из компонентов реакций является сыворотка крови. Этапы получения сыворотки:

1) взятие крови из вены в стерильные пробирки (кровь должна стекать в пробирку по стенке); 2) пробирки с кровью помещают в термостат при температуре 37^о С на 30-40 мин (для свертывания); 3) обводка (сгусток отделяется от стенок металлической спицей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой); 4) пробирки помещаются в холодильник (на 8-12 часов для ретракции сгустка); 5) переливание сыворотки в серологические пробирки стерильные (сыворотка должна быть светло-желтого цвета, прозрачная).

Работа.

Задание. Приготовить сыворотку из крови козы.

Контрольные вопросы: 1. Цели постановки серологических реакций? 2. Как классифицируются антитела, участвующих в серологических реакциях? 3. Как классифицируются антигены, участвующих в серологических реакциях? 4. Каковы этапы приготовления сыворотки из крови?

2.14.Лабораторное занятие №14 (2 часа)

Тема: «Реакция агглютинации (РА)»

2.14.1 Цель работы:

1. Изучить сущность реакции агглютинации и её модификаций. 2. Рассмотреть область применения РА в лабораторной практике. 3. Освоить методы постановки РА пробирочным и капельным методами.

2.14.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Антигены, сыворотки, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками, бруцеллезный антиген, сыворотка бруцеллезная, пастеровские пипетки, штативы

2.14.3 Описание (ход) работы:

Агглютинацией называется склеивание микробных или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролитов. Двухфазный характер этого взаимодействия ничем не отличается от механизма других двухкомпонентных реакций иммунитета: первая фаза – соединение бактерий с антителом; вторая – соединение бактерий под влиянием солевого раствора. Антиген, вступающий в реакцию, носит название агглютиногена, антитела сыворотки – агглютинины, а комплекс антигена + антитело, выпадающий при положительной реакции – агглютинат.

Реакция агглютинации используется для серологической диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бруцеллеза, сальмонеллеза, колибактериоза, сапа, листериоза, кампилобактериоза и др.

Она проводится для:

- а) обнаружения специфических антител в исследуемых сыворотках;
- б) установления вида (серогруппы, сероварианта) выделенного микроорганизма (антигена) из патологического материала с использованием известных сывороток, содержащих специфические антитела.

Агглютинация происходит при температуре 37°C в слабощелочной солевой среде.

Существует много вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая реакция агглютинации, которая проводится в пробирках с различными разведениями сыворотки; на предметных стеклах (капельная, пластинчатая: кровяно-капельная гемагглютинация; кольцевая проба (реакция) с молоком, Роз-бенгалевая проба (РБП) и др.).

Компонентами для постановки реакции агглютинации для определения вида микробы с использованием известных специфических сывороток являются:

1. Диагностические агглютинирующие сыворотки.

2. Исследуемый антиген, в качестве последнего используют взвесь микробов. Для этого суточную или 20-часовую изучаемую культуру на скошенном МПА смывают 5 мл 0,85%-ного раствора хлористого натрия и переносят в чистую пробирку.

При постановке капельным методом антигеном служит микробная культура.

3. Физиологический раствор поваренной соли.

Постановка реакции агглютинации пробирочны) методом. В качестве примера выступает РА на бруцеллез с сывороткой крови крупного рогатого скота.

Реакция ставится в объеме 1 мл жидкости. Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками; автоматическими пипетками Флоринского, одиночными (или групповыми).

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок, поставленных в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых сывороток. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки. После приготовления основного разведения сывороток в остальные 4 пробирки, кроме 2-й, каждого ряда разливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки из разведения 1:25 вносят 0,5 мл во вторую пробирку, получая разведение 1:50. Из этого

разведения готовят разведение 1:100, перенося из одной пробирки 0,5 мл жидкости. Методом последовательного разведения готовят разведение 1:200 и 1:400. Из последней пробирки (1:400) излишek жидкости 0,5 мл удаляют.

Во все пробирки, кроме первой, вносят по 0,5 мл антигена, разведенного 1:10. Таким образом получают ряд из четырех исследуемых пробирок с разведениями сыворотки 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме 0,5 мл. Первая пробирка с сывороткой в разведении 1:25 без антигена служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрин, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроля:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех разведениях, как с исследуемыми;
- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации.

После розлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно стряхивают и помещают в термостат при 37-38°C на 16-20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах:

(++++) – полное просветление жидкости, на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100%-ная агглютинация);

(++) – неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании – мелкие зерна (75%-ная агглютинация);

(+) – незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50%-ная агглютинация);

(-) – просветление жидкости, образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++)

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сыворотками крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два (++)

Для определения природы антител в исследуемом материале предложено несколько модификаций проведения реакции агглютинации.

Применяется КР с целью проверки благополучия стад на бруцеллез крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Компонентами реакции являются:

- исследуемое молоко;
- антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, который представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет;
- сыворотка позитивная бруцеллезная.

В агглютинационные пробирки берут по два мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с антигеном. При каждой постановке реакции одновременно с испытуемыми пробами молока ставят контроли: с молоком от заведомо здоровой коровы; со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока). Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водянную баню или термостат при 37-38°C на 1 час. Если в молоке имеются бруцеллезные антитела,

то они образуют с антигеном комплекс, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывают вверх, образуя синее кольцо (остальная часть молока остается белой) – реакция положительная. При отрицательной реакции столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после добавления к нему антигена, а слой сливок – белого или слегка желтоватого цвета.

Капельный метод РА применяют в основном для идентификации культур бактерий, а также для установления их принадлежности к определенным серогруппам и серовариантам. Так поступают при диагностике колибактериоза и сальмонеллезов. Техника постановки РА сводится к следующему. На предметное стекло наносят каплю сыворотки и каплю физиологического раствора (контроль). Петлю с бактериальной культурой увлажняют в капле сыворотки, затем культуру тщательно растирают рядом с каплей, смешивают с сывороткой и энергично 6-10 раз покачивают стекло круговыми движениями. Агглютинация наступает сразу или не позднее 1-2 мин. Реакцию агглютинации учитывают при хорошем освещении. Пользование лупой облегчает учет реакции.

Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную взвесь. То же самое должно быть при проведении контроля (антиген + физиологический раствор).

Роз-бенгал пробы (РБП)

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз-бенгал антигеном применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у многих видов животных.

Компонентами РБП являются:

- испытуемые сыворотки крови;
- бруцеллезный антиген для РБП, изготовленный на биопредприятиях, представляет собой стандартизированную суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет;
- позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки;
- 0,5%-ный карболизированный физиологический раствор.

Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18-30°C. Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки. При исследовании сывороток крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток других животных – 0,015 мл, тщательно смешивают покачиванием и легким вращением в течение 4 мин. Одновременно проводят контроли антигена с позитивной и негативной сыворотками, с физраствором.

Реакцию считают положительной при выраженной агглютинации окрашенных бруцелл в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

Работа.

Задание. Провести постановку и учет результатов пробирочной РА, РБП, кольцевой РА с молоком. Заполнить таблицу.

Таблица

| Вид серологической реакции | Результат реакции |
|----------------------------|-------------------|
| | |

Контрольные вопросы: 1. Опишите сущность феномена агглютинации? 2. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицируется в РА? 3. Как определить титр сыворотки в пробирочной РА?

2.15 Лабораторное занятие №15 (2 часа)

Тема: «Реакции преципитации (РП): кольце-преципитации (РКП), диффузионной преципитации (РДП)

2.15.1 Цель работы: 1. Ознакомиться с сущностью РП и ее модификаций. 2. Освоить технику постановки реакции кольцепреципитации (РКП), диффузионной преципитации (РДП).

2.15.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Пробирки Уленгута, штативы, пастеровские пипетки, антиген, сыворотка, агар Дифко, трафареты, пробойники

2.15.3 Описание (ход) работы:

Реакция преципитации (РП), как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпскулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген - антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) - преципитацией (от лат. *praecipitatio* - падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов, если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз — прогревание материала, например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии; принцип реакции преципитации использован в иммуноэлектрофорезе и встречном иммunoэлектрофорезе.

Реакция кольцепреципитации (РКП)

Известна по имени автора как реакция Асколи (1911); разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП — прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату.

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

Метод «наслаивания» антигена. В уленгутовские пробирки (диаметр 2...3 мм) вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки, 0,3...0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно насыпают на поверхность сыворотки 0,1...0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов проводят на фоне темной бумаги. Через 1...2мин в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат).

Метод «подслайвания» антител. В пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслайвают» иммунную сыворотку.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли: 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген; 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор; 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных.

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных - отрицательный результат.

Микровариант РКП. Разработан для экономии компонентов. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5-1 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1...1,5 см, закрывают верхнее отверстие капилляра указательным пальцем. Затем ватой удаляют излишек сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в раствор антигена и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают с таким расчетом, чтобы смесь сыворотки и антигена оказалась в середине капилляра, после чего закрепляют вертикально в пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

Реакция диффузионной преципитации (РДП)

Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантител, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2-7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта.

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3...4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле; агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах. В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические — анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно

эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10-72 ч.

Учет результатов: полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т. е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надосадочной жидкости после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител.)

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции:

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты - антигены оценивают как идентичные).

2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант).

3. Реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры». Такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет.

Работа.

Задание. Поставить РКП и РДП, произвести учет, заполнить таблицу.

Таблица

| Модификация РП | Учет результатов |
|----------------|------------------|
| | |

Контрольные вопросы: 1. В чем сущность феномена преципитации? 2. Техника постановки кольцевой РП. 3. Техника постановки РДП.

2.16.Лабораторное занятие №16 (2 часа)

Тема: «Реакция связывания комплемента (РСК)»

2.16.1 Цель работы: 1. Ознакомиться с сущностью реакции связывания комплемента. 2. Изучить сферы применения РСК в лабораторной практике. 2. Освоить постановку главного опыта РСК.

2.16.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы, наборы реагентов для постановки РСК.

2.16.3 Описание (ход) работы:

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело. Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным. Специфическое взаимодействие АГ и АТ сопровождается связыванием комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О.Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплекс комплексом АГ-АТ. Если АГ и АТ соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если АТ не соответствует АГ, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз.

Компоненты. Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям. Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка

(вторая система). Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, тканевых липидов, вирусы и вирусосодержащие материалы. В качестве комплемента используют свежую или сухую сыворотку морской свинки.

Механизм РСК. Реакция проводится в две фазы: 1-я фаза — инкубация смеси, содержащей три компонента антиген + антитело + комплемент; 2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсибилизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз; реакция отрицательная.

Характеристика компонентов

1. Солевой раствор для разведения компонентов: используют физиологический раствор. Более стабильные результаты иммунного гемолиза получают при введении в раствор ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , поскольку они необходимы для эффективного действия системы комплемента.

2. Эритроциты барана: эритроциты дефибринированной крови барана отмывают физиологическим раствором (2500 мин^{-1} три раза по 5 мин). В реакции обычно используют 2,5%-ю суспензию.

3. Гемолизин выпускают биофабрики. Представляет собой сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана, содержащую антитела к эритроцитам. На коробках с гемолизином указывают его активность в виде титра, определенного в реакции иммунного лизиса.

4. Комплемент — сыворотка крови морской свинки. Биофабрики выпускают комплемент в лиофилизированном виде (срок годности 1 год). В случае необходимости комплемент можно получить пункцией сердца морской свинки при помощи шприца с иглой.

5. Антиген: диагностические антигены для РСК готовят на биофабриках. На коробках с антигеном указывают его активность (титр антигена) в виде разведения, рекомендованного для использования в РСК.

6. Все исследуемые сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают при 56-64 °C в водяной бане для инактивации собственного комплемента.

При длительном хранении гемолизина и комплемента перед постановкой главного опыта РСК их титруют на гемолитической системе. Титром комплемента считают минимальное его количество, которое обеспечивает полный гемолиз суспензии эритроцитов в пробирках с негативной сывороткой и антигеном и позитивной сывороткой без антигена.

Главный опыт РСК.

Кроме исследуемых сывороток крови при постановке основного опыта РСК в качестве контрольных используют положительную и отрицательную сыворотки крови. Все сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают при 56-64 °C в водяной бане для инактивации собственного комплемента.

Результат РСК учитывают по наличию или отсутствию гемолиза эритроцитов в пробирках и выражают в крестах: 1)(+++)- полная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость прозрачная); 2) (+++)- задержка гемолиза сильно выражена (после оседания эритроцитов жидкость слаборозового цвета); 3) (++) - частичная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость интенсивно окрашена в красный цвет); 4)

(+) - слабая задержка гемолиза (незначительный осадок эритроцитов, жидкость интенсивно окрашена); 5) (-) - полный гемолиз, осадка эритроцитов нет.

Как положительный результат РСК оценивают задержку гемолиза минимум на два креста и более.

Учет результатов начинают с контрольных пробирок:

7-я пробирка - контроль физиологического раствора: гемолиза не должно быть;

6-я пробирка - контроль индикаторной системы и комплемента: должен быть полный гемолиз;

5-я пробирка - контроль антигена: должен быть полный гемолиз;

3-я пробирка - контроль с отрицательной сывороткой: должен быть полный гемолиз;

2-я пробирка - контроль с положительной сывороткой: должна быть задержка гемолиза.

Если все перечисленные контроли свидетельствуют о правильности приготовления компонентов реакции и выборе их доз, приступают к учету результатов РСК с исследуемой сывороткой крови.

Первоначально учитывают результаты в 4-й пробирке (безантigenный ряд) - контроль антикомплентарности сыворотки. При полном гемолизе в 4-й пробирке (отсутствие антикомплентарности) можно учитывать результат в 1-й пробирке (антigenный ряд), где результат может варьировать от полного гемолиза (отрицательный результат) до полной задержки гемолиза (положительный результат). Если исследуемая сыворотка антикомплентарна, то результат в первой пробирке учитывать нельзя и от этого животного необходимо брать кровь для повторного исследования. Окончательный учет результатов РСК проводят через 18...20 ч, за это время нелизированные эритроциты оседают на дно пробирки.

Рассмотрен вариант постановки РСК в объеме 1 мл, когда каждый компонент взят в объеме 0,2 мл. Возможна постановка РСК в макроварианте (2,5 мл) или в капельном варианте.

Работа.

Задание. Провести постановку главного опыта РСК. Зарисовать схему постановки РСК и заполнить таблицу.

Таблица

| Ход главного опыта РСК | Характеристика компонентов реакции |
|------------------------|------------------------------------|
| | |

Контрольные вопросы: 1. В чем сущность РСК? 2. Что представляет собой комплемент? 3. Охарактеризовать компоненты РСК. 4. Какова схема постановки главного опыта РСК? 5. В чем отличие РСК от РДСК?

2.17 Лабораторное занятие №17 (2 часа)

Тема «Иммуноферментный анализ (ИФА)»

2.17.1 Цель работы: 1. Рассмотреть сущность иммуноферментного анализа. 2. Изучить сферы применения ИФА в лабораторной практике. 3. Ознакомиться с ходом анализа.

2.17.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Спектрофотометр STAT FAX 2100, промывочное устройство, термостатируемый шейкер, многоканальные дозаторы, наборы реагентов «Вектор-Бест».

2.17.3 Описание (ход) работы:

Иммуноферментный анализ используется в двух целях: при необходимости определить наличие антигенов возбудителя какой-либо инфекции, либо (что практикуется

гораздо чаще) для установления присутствия антител класса IgA, IgM, IgG к антигену возбудителя болезни.

Принцип иммуноферментного анализа базируется на иммунной реакции антигена с антителами, когда, присоединяя к антителам ферментную метку, исследователь определяет результаты реакции антитело-антigen, фиксируя появление, либо изменение уровня ферментативной активности.

Первая реакция наблюдается между очищенным антигеном возбудителей (Ag) и устанавливаемым Ig (Ab) путем фиксирования к плоскости лунок планшета иммунолога.

Вторая иммунологическая реакция проводится с целью выявления появившихся иммунных комплексов. В роли антигена здесь используют специфический связавшийся Ig, антителами же к нему применяют коньюгат – Ig (антииммуноглобулины) к определенному Ig человека, который метят ферментом (чаще пероксидазой). Происходящую за этим ферментативную реакцию катализирует ферментная часть молекулы коньюгата. В качестве субстрата реакции применяют не имеющее цвета вещество под названием хромоген, в процессе реакции хромоген приобретает окраску. По интенсивности окрашивания лунки определяют количество находящегося в пробе иммуноглобулина.

По завершению реакции проводится фотометрирование лунки, учет результатов ведут при помощи специального прибора. Математическая обработка результатов исследования показывает наличие и количество характерных антител в пробе.

Для серодиагностики используют 96-луночный полистирольный планшет, на боковых поверхностях ячеек которого заблаговременно адсорбируют антиген. При внесении исследуемой сыворотки в ячейки планшета к антигену прикрепляются гомологичные ему антитела. Затем в ячейки помещают меченные ферментом антитела против антител (иммуноглобулинов) человека. В случае, если исследуемая сыворотка содержит определяемые антитела - они проявятся как антигены, в реакцию с которыми вступят меченные антитела. Добавленный после промывки хромоген (краситель) позволит зафиксировать реакцию по характерному окрашиванию ячеек. Интенсивность такой окраски будет пропорциональна доле фермента, и, соответственно – количеству антител.

Измеряя оптическую плотность (ОП) находящейся в ячейке жидкости и сравнивая ее с шаблонным образцом, подсчитывают концентрацию антител на единицу объема. Чаще всего результат подсчитывают в единицах ОП. Характерно, что каждая тест-система снабжена собственными показателями патологии и нормы, а также показателями учета результатов, которые и следует принимать во внимание, интерпретируя результаты.

ИФА обычно используют в гистохимическом (иммунопероксидазная реакция) и твердофазном вариантах.

Твердофазный ИФА. Применяют наиболее широко. В этом случае антитела или антигены фиксируют на нерастворимых носителях: микропанелях, стеклянных или нейлоновых шариках.

При различных вариантах реакции результаты учитывают инструментально или визуально.

Обнаружение антигена (антител) по схеме «сэндвич». Для обнаружении АТ в исследуемой сыворотке лунки полистироловых микропанелей, сенсибилизируют специфическими для искомого антитела антигеном. Добавляют в лунки образцы сывороток, инкубируют в шейкере-инкубаторе при 37°C, отмывают лунки от несорбированных антител фосфатно-буферным раствором. Далее в лунки вносят коньюгат (меченные ферментом, чаще всего пероксидазой хрена, антивидовые моноклональные АТ); панели инкубируют при 37°C, затем их отмывают от несвязавшихся антител.

В лунки вносят субстрат (перекись водорода) и хромоген (чаще всего тетраметилбензидин - ТМБ) инкубируют в темноте при 20-22 °C 5-30 мин, при наличии иммунных комплексов в лунках наблюдается синее окрашивание.

Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты (для пероксидазы), синее окрашивание меняется на желтое.

Учет результатов визуальный или спектрофотометрический.

Обнаружение антигенов основано на том же принципе, но твердофазный носитель сенсибилизируют известным антителом, добавляют исследуемый материал, затем коньюгат. Вносят субстрат и по цветной реакции судят о наличии или отсутствии антигенов в исследуемом материале.

Работа.

Задание. Изучить технику постановки ИФА, пронаблюдав за ходом реакции, зарисовать схему. Заполнить таблицу.

Таблица

| Проба сыворотки | Результат реакции |
|-----------------|-------------------|
| | |

Контрольные вопросы: 1. Описать сущность ИФА. 2. Перечислить оборудование, необходимое для постановки реакции. 3. Как происходит учет результатов реакции?

2.18 Лабораторное занятие №18 (2 часа)

Тема: «Метод флуоресцирующих антител (МФА). Реакция нейтрализации (РН)»

2.18.1 Цель работы: 1. Ознакомиться с принципом МФА и техникой постановки. 2. Изучить сущность реакции нейтрализации, оценить сферы её применения в лабораторной практике. 3. Освоить методы постановки реакции для обнаружения бактериальных токсинов.

2.18.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы.

2.18.3 Описание (ход) работы:

Реакцию иммунофлуоресценции, предложил Кунс в 1942 году. Однако эта старая реакция получила в настоящее время "вторую жизнь" благодаря появлению гибридомных технологий, позволяющих получать моноклональные антитела. Их применение позволило значительно увеличить ее чувствительность и специфичность. Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстрой получения ответа. Сегодня в этой реакции используются как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела меченные флюоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ). Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку мазка бычьим сывороточным альбумином, меченым родамином или голубым Эванса. Это комплексный метод сочетает в себе серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса, и микроскопическое исследование под люминесцентным микроскопом, с помощью которого этот комплекс обнаруживают.

Преимущество РИФ состоит в том, что с его помощью возможно за два-три часа серологически идентифицировать микроорганизм непосредственно в патологическом материале, без выделения в чистой культуре (экспресс-метод). РИФ применяют и для выявления антител в крови животных.

Приготовление препарата для РИФ. При выявлении возбудителя инфекции (антигена) на предметном стекле готовят мазки-отпечатки из органов или другого материала. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют ацетоном (5 мин), или этанолом (10.... 15 мин), или метанолом (5...10 мин). Препарат можно фиксировать и нагреванием, как при обычной световой микроскопии. Мазки-отпечатки из органов и тканей лучше обрабатывать охлажденным до -20 °С ацетоном 2...4 мин. В зависимости от

конкретных задач окрашивание готовых препаратов люминесцирующими сыворотками проводят различными способами.

Прямая РИФ. Разработал Coons с соавт. (1950). На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей иммунной сыворотки в рабочем разведении, содержащей антитела против искомого антигена. Чтобы избежать высыхания, препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри) с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при 37-38 °C 15-30 мин. Затем препарат 5-10 мин промывают от несвязавшихся иммуноглобулинов проточной (водопроводной) водой с pH не ниже 7,0. Промытый препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Прямая РИФ используют только для идентификации неизвестного антигена; к его недостатку относят необходимость приготовления люминесцирующей сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Непрямая РИФ. Применяют в двух вариантах.

Двухступенчатая РИФ - предложили Weller и Coons (1954). Этот вариант считают более универсальным, так как при помощи одной люминесцирующей антителой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов.

На антиген наносят каплю немеченой иммунной сыворотки (сыворотка первой ступени). Препарат выдерживают в термостате 15-30 мин, затем его промывают, чтобы удалить несвязавшиеся антитела иммунной сыворотки, и просушивают (см. прямой вариант). Если антитела сыворотки первой ступени соответствуют антигену, то вода не вымывает образовавшийся АГ-АТ-комплекс (антитела зафиксированы на антигене).

На подсушенный препарат наносят каплю люминесцирующей антителой сыворотки (сыворотка второй ступени) в рабочем титре. Препарат повторно помещают в термостат во влажной камере на 15-30 мин, затем промывают водой и подсушивают. Антителовая сыворотка представляет собой меченные флуорохромом антитела против иммуноглобулинов крови животного того вида, от которого получена иммунная сыворотка первой ступени. Таким образом, антитела первой сыворотки служат антигеном для меченых антител антителовой сыворотки. В результате к образовавшемуся на первом этапе АГ—АТ-комплексу присоединяются антитела второй ступени, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе.

Универсальность непрямого варианта обусловлена тем, что, используя на первом этапе полученные от животных одного вида (например, от лошадей) иммунные сыворотки против различных микроорганизмов, на втором этапе с помощью одной антителой сыворотки можно идентифицировать неограниченное количество возбудителей инфекционных болезней.

Трехступенчатая РИФ представляет собой вариант РСК на стекле. В данном случае в иммунном комплексе на стекле при помощи люминесцирующей сыворотки выявляют связанный комплемент.

Наибольшее распространение получили наборы, основанные на прямой реакции иммунофлюоресценции (ПИФ), однако имеются тест-системы, использующие реакцию непрямой иммунофлюоресценции

Оценка результатов РИФ. Учитывают яркость свечения, цвет, локализацию и структуру свечения. Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: 1) (++++) - очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темной центральной частью клетки; 2) (+++) - яркая флуоресценция периферии клетки; 3) (++) - слабое свечение периферии клетки; 4) (+) - нет контрастного свечения периферии и центральной части микробной клетки. Отсутствие специфического свечения обозначают знаком «минус» (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей болезней положительным результатом чаще считают специфическое свечение бактериальных клеток не ниже, чем на четыре или три креста.

Реакция нейтрализации

Реакцию нейтрализации относят к иммунологическим реакциям, в которых, например, учитывают потерю биологической активности антигена при взаимодействии с гомологичными антителами. Если антигеном служит бактериальный экзотоксин, то он теряет свои токсические свойства (нейтрализуется), вирус как антиген теряет в этом случае инфекционное действие и т. д.

В бактериологических диагностических исследованиях наиболее часто используют РН как метод обнаружения и идентификации бактериальных токсинов.

РН бактериального экзотоксина. Используют при диагностике таких бактериозов, как ботулизм, инфекционная энтеротоксемия овец и др., возбудители которых (*C. botulinum*, *C. perfringens*) синтезируют сильный экзотоксин. Для постановки диагноза на эти бактериальные инфекции достаточно обнаружить экзотоксин в РН. Рассмотрим технику постановки РН на примере обнаружения токсинов *C. perfringens*. Для постановки РН необходимы диагностические иммунные сыворотки, содержащие антитела к определенному бактериальному токсину, - антитоксические сыворотки. Такие диагностические сыворотки получают путем гипериммунизации животных-продуцентов антотоксинами, токсинами инактивированными (формальдегидом), но сохранившими свои иммуногенные свойства. *C. perfringens* продуцирует шесть типов экзотоксинов, различающихся по антигенной структуре (A, B, C, D, E, F).

Исследуемый материал, в котором предположительно находится токсин (содержимое кишечника), разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1, экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют при 5000 мин⁻¹ 20 мин. Надосадочную жидкость вводят внутрибрюшинно или внутривенно по 0,5 мл двум белым мышам массой 16-18 г. При наличии токсина в исследуемом материале животные погибают в течение 12 ч. После обнаружения токсина его идентифицируют в реакции нейтрализации.

Диагностические антитоксические сыворотки (типов А, С, Д, Е) предварительно разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 10 ед/мл. Содержимое каждой пробирки после инкубирования вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 0,5 мл двум белым мышам. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч. Если токсин принадлежит *C. perfringens*, то мыши, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, остаются живы.

Работа.

Задание. Освоить технику постановки реакции нейтрализации по выявлению и идентификации токсинов *C. perfringens*. Учесть результат и заполнить таблицу.

Таблица

| Заражение мышей смесью токсина и сывороток | Результат реакции |
|--|-------------------|
| | |

Контрольные вопросы: 1. В чем сущность одноступенчатой, двухступенчатой и трехступенчатой РИФ? 2. Для каких целей используют РИФ? 3. В чем сущность реакции нейтрализации? 4. Для диагностики каких инфекций используется эта реакция? 5. Какие тест-объекты чаще всего используются в лабораторной практике?

2.19 Лабораторное занятие №19 (2 часа)

Тема: «Возбудители стафилококкозов»

2.19.1 Цель работы: 1. Изучить лабораторную диагностику стафилококкозов.

2.19.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *S. aureus*, бактериологические петли, диффрид, термостат

2.19.3 Описание (ход) работы:

Стафилококкозы - заболевания, встречающиеся у многих видов млекопитающих, в том числе и у человека. Патогенные стафилококки - вызывают гнойно-воспалительные процессы различной локализации: местные – фурункулы, абсцессы и др.; в отдельных органах – маститы, эндометриты и др.; общее поражение – пневмия и септицемия. пищевые токсикозы (токсикоинфекции). Род *Staphylococcus* входит в семейство *Micrococcaceae*. Данный род включает три вида: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *St. saprophyticus*. Вместе с тем, сейчас уже известно ещё 10 видов стафилококка, которые пока не включены в официальную систематику. Это *St. xylosus*, *St. haemolyticus*, *St. cohnii*, *St. wameri*, *St. cupitis*, *St. scinri*, *St. simulans*, *St. hominis*, *St. hyicus*, *St. intermedium*.

Материал для исследования: раневой экссудат, гной абсцессов, ран, молоко при маститах, выделение из половых органов при эндометритах, кровь при септицемии.

Микроскопия. Методы окраски: простой метод и по Граму; микрокартина: шаровидные клетки располагаются беспорядочно, диаметр 0,5-1,5 мкм; грамположительные; спор не образуют; капсулу не образуют (за исключением патогенных штаммов *S. aureus*), спор не образуют. Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, МПА с 15% хлорида натрия, кровяной МПА, ЖСА, МЖСА.

Особенности выделения чистой культуры: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов. Культуральные свойства: на МПА – колонии округлые, диаметром 2-5 мм, с ровным краем, могут быть окрашены в золотистый цвет (*S. aureus*), белый (*S. epidermidis*), лимонно-желтый (*S. saprophyticus*). На жидких средах: на МПБ – равномерное помутнение с выпадением рыхлого хлопьевидного осадка.

Биохимические свойства (ферментативная активность): ферментация маннита без газа (в анаэробных условиях); гемолиз на кровяных средах; ДНК – азная активность; рост на элективных средах; плазмокоагуляция. На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком.

Из культур, выросших на питательных средах, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении бактерий с типичными для стафилококков культурально-морф-логическими признаками приступают к изучению свойств, прямо или косвенно свидетельствующих о патогенности выделенного стафилококка.

Патогенные стафилококки в отличие от непатогенных образуют капсулу (*S. aureus*), выделяют гемолизин, фибринолизин (стафилокиназу), гиалуронидазу, плазмокоагулазу, желатиназу, ДНК-азу, лецитиназу, ферментируют маннит. Важнейшим из перечисленных факторов считают плазмокоагулазу: у 90-95% плазмокоагулирующих стафилококков выражена способность продуцировать энтеротоксин.

Биопроба. Заражают лабораторных животных для подтверждения токсигенных свойств выделенного стафилококка. Летальный токсин выявляют внутривенным введением кролику фильтрата бульонной культуры 0,75 мл на 1 кг массы.

Некротоксин обнаруживают внутрикожной пробой. Готовят суспензию суточной культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $4,2 \cdot 10^9$ /мл и $1 \cdot 10^9$ /мл. Каждое разведение культуры по 0,1 мл вводят внутрикожно кролику, предварительно удалив шерстный покров на месте инъекции. Результаты учитывают ежедневно на протяжении 4-5 сут. В положительных случаях развивается некроз кожи.

Энтеротоксин продуцируют токсигенные штаммы. Пробу на энтеротоксин ставят при отравлениях. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8% агар-агара, pH 7,2), в атмосфере, содержащей 20% оксида углерода (IV), в течение трех суток. Затем культуру

стерилизуют фильтрованием, 10-15 мл фильтрата смешивают с равным объемом молока и скармливают 4...8-недельным котятам. При наличии энтеротоксина через 1-2 ч у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвоты.

Биопроба для определения свойств: летальных – на кроликах; дерматонекротических – на кроликах; токсических – на котятах.

Серологическая диагностика в ветеринарии не используется.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культур стафилококков, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Описать культуральные свойства стафилококков. Изучить ферментативные свойства стафилококков. Результаты исследований занести в таблицу.

Таблица

| Описание культуральных свойств стафилококков | Идентификация вида стафилококка по биохимическим свойствам |
|--|--|
| | |

Контрольные вопросы: 1. Основные виды патогенных стафилококков? 2. Морфологические, культуральные, биохимические свойства стафилококков? 3. Как дифференцировать патогенные виды стафилококков от непатогенных?

2.20 Лабораторное занятие №20 (2 часа)

Тема: «Возбудитель колибактериоза»

2.20.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики колибактериоза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей колибактериоза. 3. Изучить биопрепараты.

2.20.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *E. coli*, бактериологические петли, стекла с лунками, термостат, набор сывороток для серотипизации, биопрепараты

2.20.3 Описание (ход) работы:

Эшерихиоз (колибактериоз) – это острая инфекционная болезнь. Проявляется профузным поносом, признаками тяжелой интоксикации и обезвоживанием организма. Болеет молодняк сельскохозяйственных животных многих видов, включая птиц. Эшерихиоз может протекать в энтеритной, септической и энтеротоксемической формах.

Возбудители колибактериоза (эшерихиоза) 0 патогенные варианты бактерии. *E. coli*, род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*.

При энтеритной форме болезни возбудитель локализуется, в кишечнике и регионарных брыжеечных лимфоузлах; при септической форме 0 в крови, внутренних органах и тканях; при энтеротоксемической 0 в тонком отделе кишечника и брыжеечных лимфоузлах. Считают, что ведущая роль в развитии эшерихиоза принадлежит кишечным палочкам, адгезивные антигены которых (K 88, K 99, F 41, 987 P, A 20 и др.) обеспечивают прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам тонкого отдела кишечника с последующим их размножением в клетках, продуцированием энтеротоксинов и проникновением сначала в регионарные лимфоузлы, а затем в кровь.

Эшерихии в своем составе содержат 164 варианта О-антитела, 55 вариантов Н-антитела и 90 вариантов К-антитела.

О-Антиген (соматический) термостабильный, состоит из полисахаридно-липидно-протеинового комплекса, который определяет серогрупповую принадлежность бактерий (известно свыше 160 серологических групп эшерихий).

У поросят-отъемышей энтеротоксемическая форма колибактериоза называется отечной болезнью.

Лабораторная диагностика эшерихиоза основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры, идентификацию возбудителя на уровне вида и определение его принадлежности к группе патогенных вариантов.

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики колибактериоза в лабораторию направляют фекалии больных животных (не менее чем от 5 животных с одной фермы), не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Пробы фекалий массой 1-2 г от каждого животного берут из прямой кишки в стерильные пробирки с помощью прокипяченного резинового катетера.

Микроскопия мазков из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму.

E. coli - палочковидная грамотрицательная бактерия размером (0,3-1) x (1...6) мкм со жгутиками (за редким исключением), спор и капсул не образует. Микробные клетки располагаются одиночно, парно или в виде коротких цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *E. coli* - факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38 °С, рН 7,2-7,4, к питательным средам нетребователен. Посевы из паренхиматозных органов делают на среду Эндо или Левина методом отпечатков или наносят материал на поверхность среды пастеровской пипеткой и равномерно растирают шпателем.

Пробы фекалий (не более 0,5 г) или соскобы со слизистой оболочки кишечника от каждого животного помещают в отдельную стерильную пробирку, затем разводят в 10 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают и выдерживают 10-15 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость засевают бактериологической петлей в чашки со средой Эндо или Левина для получения изолированных колоний. Для колоний эшерихий характерно следующее: круглые, с ровными краями, с гладкой выпуклой поверхностью, размером 2-4 мм, малинового цвета - на среде Эндо и темно-фиолетового - на среде Левина. Иногда у колоний отмечают металлический блеск.

Колонии пересевают на МПА и среду Минка. При поддержании на обычных средах эшерихий быстро утрачивают адгезивные факторы, при культивировании на среде Минка - сохраняют. В состав указанной среды входят буфер (рН 7,5), соли магния, марганца, хлорид железа, хлорид кальция, гидролизат лактальбумина, глюкоза, агар. При подозрении на отечную болезнь поросят дополнительно делают высеив на кровяной МПА, поскольку штаммы, вызывающие эту патологию, обычно синтезируют бета-гемолизин.

При обнаружении бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для *E. coli* биохимические свойства не изучают, а сразу исследуют в РА на стекле с агглютинирующими антиадгезивными сыворотками, вначале с комплексной, а затем при получении положительного результата с моновалентными сыворотками. Культуры, выросшие на МПА, проверяют с сыворотками К 88, 987 Р и А 20, культуры со среды Минка - с сыворотками К 99 и F41. При положительной РА культуры относят к возбудителям эшерихиоза и на этом заканчивают их дальнейшее изучение.

При отсутствии эшерихий с адгезивными антигенами культуру идентифицируют на основании изучения ферментативных признаков. Для *E. coli* характерно расщепление глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, выделение индола, отсутствие уреазы и неспособность утилизировать цитраты. У культур, идентифицированных как *E. coli*,

устанавливают О-серогрупповую принадлежность как косвенный показатель патогенности или изучают патогенность в биопробе на белых мышах, цыплятах.

О-Серогруппу эшерихий устанавливают следующим образом. Культуры, выращенные на скошенном МПА при 37°C в течение 18-20 ч, смывают физиологическим раствором, переносят в сухие стерильные пробирки, прогревают в водяной бане при 100 °C 1 ч для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов или автоклавируют при 120°C 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 2000-3000 мин-1 10-15 мин и осадок используют в качестве антигена для постановки РА на стекле. Оставшуюся часть антигена разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \cdot 10^3$ /мл и ставят пробирочную РА.

Определение серогрупповой принадлежности культур начинают с постановки РА на стекле с групповыми поливалентными сыворотками: на чистое обезжиренное стекло наносят по капле поливалентные сыворотки. В каждую каплю петлей вносят осажденную центрифугированием культуру, и хорошо смешивают, результат учитывают в течение 3 мин. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и просветлением жидкости. При отрицательном результате вся капля остается мутной.

Антиген, агглютинирующийся одной из поливалентных групповых сывороток, исследуют в РА на стекле с моновалентными сыворотками, разведенными в соотношении 1:10 и входящими в состав данной поливалентной сыворотки. Затем с моновалентной сывороткой, давшей положительную реакцию, ставят РА в пробирках в объеме 1 мл. Сыворотку разводят физиологическим раствором 1 : 25 до титра, указанного на этикетке: сначала готовят исходное разведение - к 2,4 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл сыворотки, в остальные пробирки разливают по 0,5 мл физиологического раствора, из исходного разведения переносят 0,5 мл смеси во вторую, перемешивают, из второй - в третью и т.д., из последней пробирки удаляют 0,5 мл смеси, из первой - 1,5 мл. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл антигена. Одновременно ставят контроли.

Биопроба. Готовят суспензию культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $1 \cdot 10^9$ /мл по бактериальному стандарту мутности и вводят по 0,5 мл внутрибрюшинно трем белым мышам массой 14-16 г и трем цыплятам трех-четырехнедельного возраста (при исследовании материала от птиц). В случае гибели двух зараженных мышей и более или цыплят выделенную культуру считают патогенной.

Биопрепараты. Вакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсаловая против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят, вакцина поливалентная против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей, коли-протектан ВИЭВ.

Сыворотка поливалентная против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных.

Работа.

Задание. Изучить морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства *E. coli*. По результатам работы заполнить таблицу.

Таблица

| Морфологические свойства <i>E. coli</i> . | Культуральные свойства <i>E. coli</i> . | Биохимические свойства <i>E. coli</i> . |
|---|---|---|
| | | |

Контрольные вопросы: 1. Какие дифференциально-диагностические среды применяют для выделения *E. coli*? 2. Каковы основные биохимические свойства *E. coli*? 3. Как определяют патогенность *E. coli*?

2.21 Лабораторное занятие №30 (2 часа)

Тема: «Возбудители сальмонелллёзов»

2.21.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики сальмонеллёза. 2.

Рассмотреть биологические свойства возбудителей сальмонеллёза. 3. Изучить биопрепараты.

2.21.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами сальмонелл, бактериологические петли, диффрияд, набор сывороток для серотипизации, биопрепараты.

2.21.3 Описание (ход) работы:

Сальмонеллезы - группа инфекционных болезней преимущественно молодняка с.х. животных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом – воспалением легких. У взрослых животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны abortionы. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Сем. *Enterobacteriaceae* Род: *Salmonella* Виды сальмонелл, имеющих наибольшее значение в патологии животных: *S. enteritidis (dublin)* - у телят; *S. choleraesuis (suipestifer)* - у поросят; *S. typhimurium* - у свиней; *S. typhimurium* - у водоплавающей птицы; *S. abortus* - у кобылы; *S. abortusovis* - у овец; *S. pullorum (S. gallinarum)* - у птиц.

Материал для исследования: при жизни – кал, сыворотка крови; посмертно – трупы мелких животных и птиц, паренхиматозные органы, мезентеральные лимфатические узлы, abortированный плод.

Микроскопия: палочки с закругленными концами до 4 мкм, располагаются одиночно или попарно; грамотрицательные; спор не образуют; капсулу не образуют; подвижны (за исключением *S. pullorum*).

Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, дифференциальнопатологические – Эндо, Левина, висмут-сульфит-агар, накопительные (Кауфмана, Мюллера). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов.

Культуральные свойства: на МПБ – интенсивное помутнение, образование легко разбивающегося осадка, на МПА – сочные, круглые с ровными краями серо-белого цвета колонии, на среде Эндо – бесцветные или розоватые колонии, на среде Левина – светло-фиолетовые колонии.

После выделения чистой культуры лактозоотрицательных бактерий устанавливают их родовую принадлежность, затем дифференцируют до вида и сероварианта. С этой целью изучают их биохимические свойства и антигенные строение путем постановки пластинчатой реакции агглютинации (серологическая дифференциация).

Биохимические свойства: обладают высокой сахаролитической активностью; для установления родовой принадлежности проводят посевы на короткий «цветной ряд» (среды Гисса) при этом сальмонеллы ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не расщепляют лактозу и сахарозу; дальнейшее изучение для установления видовой принадлежности проводят путем посевов на длинный «цветной ряд», в состав которого входят углеводы, и другие тесты; сальмонеллы не разжижают желатин, образуют сероводород, не образуют индол; дают положительную реакцию с метиловым красным: среда окрашивается в розово-красный цвет, отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра – желтое окрашивание среды.

Биопроба: в необходимых случаях заражают подкожно белых мышей.

Серологический метод: используют РА с сывороткой крови (кровью) при диагностике паратифозного abortionа кобыл, пуллороза у кур; используют РА для дифференциации выделенной культуры сальмонелл с целью определения их вида и

сероварианта; у сальмонелл различают соматический термостабильный антиген и жгутиковый термолабильный антиген; культуру сальмонелл предварительно проверяют с групповыми (поливалентными) сальмонеллезными агглютинирующими сыворотками в РА на стекле. На основе общего для нескольких видов сальмонелл антигена они подразделяются на серологические группы, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита. При положительном результате с групповой сывороткой испытания той же культуры, выросшей на скошенном МПА с отдельными монорецепторными сыворотками, входящими в смесь поливалентной сыворотки. Затем эти же культуры испытывают с монорецепторными сыворотками, 1-й и 2-й фазы, обозначенными цифрами и малыми буквами, используют также РИФ, ИФА.

Биопрепараты: вакцина поливалентная ГОА формолтиомерсаловая против колибактериоза; сыворотка поливалентная против колибактериоза, концентрированная формолквасцовавакцина против сальмонеллеза телят, ассоциированная вакцина против пароатифа, пастереллеза, диплококковой септицемии, сухая живая вакцина против пароатифа свиней из штамма ТС-177, живая сухая вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы и др.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культур сальмонелл, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Изучить культуральные и биохимические свойства сальмонелл, заполнить таблицу. Ознакомится с порядком проведения серотипизации с помощью групповых и типовых сывороток. По результатам работы заполнить таблицу.

Таблица

| Вид микроорганизма | Культуральные свойства | Биохимические свойства |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |

Контрольные вопросы: 1. Описать морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей сальмонеллеза. 2. Основные этапы лабораторной диагностики сальмонеллеза. 3. Какие серологические реакции используются для серотипизации сальмонелл?

2.22 Лабораторное занятие №22 (2 часа)

Тема: «Возбудитель рожи свиней»

2.22.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики рожи свиней. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителя рожи свиней. 3. Изучить биопрепараты.

2.22.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *E. rhusiopathiae*, бактериологические петли, диффрияд, сыворотка для серотипизации.

2.22.3 Описание (ход) работы:

Возбудитель рожи свиней - бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вызывает инфекционную болезнь, характеризующуюся при остром течении септицемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом - эндокардитом и артритами. Болеют животные преимущественно в возрасте 3-12 мес. Бактерию открыли Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г. Представитель отдела *Firmicutes* и рода *Erysipelothrix*. Рожа свиней - инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении септицемией и воспалительной эритемой кожи, при подостром - «крапивницей», при хроническом - эндокардитом и артритами.

Материал для исследования: труп целиком, паренхиматозные органы, сердце, трубчатая кость.

Микроскопирование (метод, по Граму). Микрокартина: тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки до 1,5 мкм, грамположительные; спор и капсулу не образуют; неподвижны.

Культивирование. Посев на питательные среды: МПА, МПБ, МПЖ, ПЖА, среда Сент-Иваны (МПА с 0,1% кристаллиолета и 1% азida натрия). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37оС; срок культивирования 18-20 часов – до 48 часов

Культуральные свойства: на МПА – мелкие, росинчатые, прозрачные колонии, на МПБ – легкое помутнение, на МПЖ – равномерные отростки, отходящие от центрального стержня.

Биохимические свойства: обладают сахаролитическими свойствами, не расщепляют салицин; образуют сероводород.

Биопроба: заражают белых мышей, голубей, кроликов.

Серологический метод: РА выделенная культура с лечебной сывороткой 1:50, РИФ.

Биопрепараты. Сухая и жидккая живые вакцины против рожи свиней из штамма ВР-2, лечебно профилактическая противорожистая сыворотка.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культур возбудителей рожи свиней, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителя, заполнить таблицу.

Таблица

| Морфологические свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | Культуральные свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | Биохимические свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> |
|---|---|---|
| | | |

Задание. Поставить капельную РА.

Задание. Ознакомится с биопрепаратами.

Контрольные вопросы: 1. Описать морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей рожи свиней. 2. Охарактеризовать основные этапы лабораторной диагностики рожи свиней? 3. Какие серологические реакции используются для диагностики рожи свиней?

2.23 Лабораторное занятие №23(2 часа)

Тема: «Возбудители туберкулёза»

2.23.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики туберкулёза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей туберкулёза. 3. Изучить биопрепараты.

2.23.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Цилю-Нильсену, пробирки с культурами вакцинного штамма микобактерий, готовые микропрепараты, бактериологические петли, дифряд, биопрепараты.

2.23.3 Описание (ход) работы:

Туберкулез - инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц. Патологоанатомически характеризуется образованием туберкул и творожисто-перерожденных туберкулезных очагов.

Микроорганизмы относятся к роду *Mycobacterium* (лат. mycos - гриб, bacterium - палочка) включает в себя 49 видов как патогенных, так и непатогенных. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), животных (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*).

Материал для исследования: молоко, моча, слизь, пораженные органы и ткани.

Микроскопия. Метод окраски - по Цилю-Нильсену (микобактерии окрашиваются в красный цвет, фон и все остальные микроорганизмы – в синий).

Микрокартина: прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными краями длиной от 1,5 до 4, шириной от 0,2 до 0,5 мкм; грамположительны; спор не образуют; капсул не образуют; неподвижны; кислото-спирто-щелочеустойчивые.

Культивирование. Посев на питательные среды: МПГБ, глицериновый картофель, Петраньяни, Гельберга, Сотона, Моделя.

Особенности выделения возбудителя: аэробы; оптимальная температура культивирования: 37-38°C для *M. tuberculosis*; 38-39°C для *M. bovis*; 39-41°C для *M. avium*; срок культивирования 7-30 дней и более.

Культуральные свойства: на жидких питательных средах характеризуется наличием рыхлой, матовой, крошкоподобной или сплошной, морщинистой, блестящей пленки соответствующего цвета; на плотных средах микобактерии растут в виде S- или R-форм крошкоподобных мелких либо крупных, блестящих или матовых единичных обособленных колоний или же сплошных скоплений, а также в виде морщинистого налета белого или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета, вирулентные культуры *Mycobacterium bovis* на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. *Mycobacterium tuberculosis* также растут в виде сферических колоний, которые встречаются как в R-, так и в S-форме. *Mycobacterium avium* растут гладкими, мелкими, круглыми, белыми, блестящими, с ровными краями колониями, располагающимися как единично, так и скоплениями или в виде сплошного слизистого налета.

Биохимические свойства: тесты для биохимической дифференциации микобактерий: ниациновый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, разрушение салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5 %-ному хлориду натрия, пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гиролиз твина-80 и др.

Биопроба. Заключается в определении патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые по-разному чувствительны к различным микобактериям туберкулеза. Для этого используют двух кроликов массой не менее 1,5-2 кг которым в краевую вену уха вводят суспензию культуры микобактерий на физиологическом растворе. Первому вводят 0,1; второму - 0,01 мг бактериальной массы. *Mycobacterium bovis* на протяжении 3 мес вызывает генерализованное поражение бугорковой формы. При заражении *Mycobacterium tuberculosis* за этот же период возникают нетипичные туберкулезные очажки регрессивного характера. *Mycobacterium avium* вызывает у кроликов септическую форму болезни без образования специфических патологоанатомических изменений с летальным исходом в течение 2-3 нед. Заражение двух морских свинок такими же дозами культуры позволяет дифференцировать *Mycobacterium avium*, к которым они нечувствительны, от *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*, которые вызывают у них прогрессивные туберкулезные изменения. У кур, зараженных внутривенно дозой в 1 мг бактериальной массы, *Mycobacterium avium* вызывают туберкулезные поражения селезенки, печени и кишечника. Куры к *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* менее чувствительны.

Серологическая диагностика. Используют реакцию связывания комплемента (РСК) с антигенами УНИИЭВ и СибНИВИ; реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Аллергическая диагностика. Применяют сухой очищенный туберкулин (протеин-пурифиед-дерииват - ППД). В ветеринарии используют стандартизованный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих и сухой очищенный туберкулин (ППД) для птиц, который применяют для диагностики у птиц и свиней.

Биопрепараты. В ветеринарной практике от вакцины БЦЖ отказались.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культуры вакцинного штамма БЦЖ, окрасить по Цилю-Нильсену, промикроскопировать, зарисовать. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей. По результатам выполненной работы заполнить таблицу.

Таблица

| Морфология микобактерий | Вид в препарате (рисунок) | Культуральные свойства | Биохимические свойства |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | |

Задание. Ознакомится с биопрепаратами.

Контрольные вопросы: 1. Описать морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей туберкулеза? 2. Какие основные этапы лабораторной диагностики туберкулеза? 3. Аллерген, используемый при аллергической диагностики туберкулёза?

2.24 Лабораторное занятие №24 (2 часа)

Тема: «Возбудитель бруцеллеза»

2.24.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики бруцеллёза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей бруцеллёза. 3. Изучить биопрепараты.

2.24.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы готовые микропрепараты, антигены, сыворотки, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками, бруцеллезный антиген, сыворотка бруцеллезная, пастеровские пипетки, штативы.

2.24.3 Описание (ход) работы:

Бруцеллез (brucellosis) – хроническая инфекционная болезнь животных и человека. У многих животных проявляетсяabortами и задержанием последа, орхитами, рождением нежизнеспособного молодняка и бесплодием. В связи с социальной опасностью бруцеллез включен в список карантинных болезней.

Бактерии из рода *Brucella* подразделяют на 6 видов: *Br. abortus* (возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота); *Br. melitensis* (овец и коз; особенно восприимчив человек); *Br. suis* (свиней); *Br. neotomae* (крыс); *Br. ovis* (инфекционного эпидидимита баранов); *Br. canis* (бруцеллез собак).

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологических и серологических исследований.

Бактериологическое исследование в основном применяют при первичной постановке диагноза на бруцеллез в ранее благополучных хозяйствах.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы крови (сыворотки) для серологических исследований, abortированный плод с плодными оболочками, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей или желудок плода, кусочки печени, селезенки, пробы молока (последние порции). При убое животных берут

паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов - семенники. Объектом исследования могут быть молочные продукты (бройла, сыр, масло и др.), объекты внешней среды.

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и др.). Бруцеллы - грамотрицательные короткие палочковидные или кокковидные бактерии размером 0,5... 1,5 мкм, без жгутиков, спор не образуют, формируют микрокапсулу. В окрашенном препарате располагаются одиночно, реже парами, короткими цепочками.

Окраска по методу Козловского: препарат окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 2 мин, промывают водой, докрашивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 1 мин, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые.

Окраска по методу Стампа: фиксированный на пламени мазок окрашивают фуксином Пфейффера 10 мин, промывают водой, обрабатывают 0,5%-м водным раствором уксусной кислоты 30 с, затем препарат промывают водой и докрашивают 1%-м водным раствором метиленового синего 20-30 с. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, другие бактерии синие.

Выделение возбудителя. Бруцеллы - аэробы, микроаэрофилы, температурный оптимум 37-38°C, рН 6,8-7,2. Материал засевают на специальные питательные среды: мясо-пептонный агар и бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый агар и бульон, картофельный агар, эритрит-агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Печеночные среды включают в себя отвар печени. Картофельный агар готовят на отваре картофеля, глюкозу и глицерин добавляют в среды соответственно в количестве 1% и 2-3 %. Эритрит-агар содержит вещество (эрритрит), стимулирующее рост бруцелл. В состав сывороточно-декстрозного агара помимо обычной питательной основы входит 10 % сыворотки крови и 1 % декстрозы.

Некоторые виды бруцелл растут при повышенном содержании в атмосфере оксида углерода (IV) (*B. abortus*, *B. ovis*). Так как неизвестно, каким видом бруцелл заражен исследуемый материал, половину посевов инкубируют в обычной атмосфере, другую - в атмосфере, содержащей 10-15% оксида углерода (IV).

Посевы культивируют в течение 30 сут, периодически просматривая. Рост бруцелл чаще появляется на 7-10-е сутки, иногда позже.

На плотных средах возбудитель формирует мелкие, прозрачные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком колонии (S-форма), возможно появление шероховатых колоний (R-форма). По мере старения колонии мутнеют и за счет пигментообразования могут темнеть. На жидких питательных средах рост бруцелл проявляется равномерным помутнением среды, образованием голубоватого пристеночного кольца, позднее формируется небольшой осадок.

У выросших культур изучают морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по методам Грама, Козловского.

Культуру идентифицируют серологически в РА на стекле с позитивной бруцеллезной сывороткой, разведенной в соотношении 1:50. Виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* антигенно родственны, поэтому их клетки агглютинируют в стандартной бруцеллезной сыворотке. Для идентификации *B. ovis* кроликов иммунизируют выделенной культурой и затем кроличью сыворотку исследуют в РДСК со стандартным овисным антигеном (*B. ovis*) - должна быть четкая положительная реакция, если это культура *B. ovis*.

Для определения видовой принадлежности у выделенных культур бруцелл изучают потребность в оксиде углерода (IV), образование сероводорода, способность к росту на питательных средах с тионином и фуксином, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, ферментацию аминокислот, углеводов, а также агглютинабильность с

моноспецифическими сыворотками против отдельных клеточных антигенов бруцелл (A, M, R).

Биопроба. Это эффективный метод обнаружения бруцелл в исследуемом материале, особенно загрязненном. Морских свинок перед заражением исследуют в РА, в опыт берут животных, в сыворотке которых не обнаружены антитела к возбудителю. Тканевый материал в виде суспензии (1:10) в объеме 1 мл вводят подкожно. О результате биопробы судят по данным исследования сыворотки крови на 15, 25 и 40-й день после заражения (животные не погибают). Появление антител в титре 1:10 и более оценивают как положительный результат. Реагирующих животных убивают и подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика: при массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, роз-бенгал пробу (РА на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР).

Биопрепараты. Живая сухая вакцина против бруцеллеза из слабоагглютиногенного штамма № 82, живая вакцина против бруцеллеза овец из штамма Рев-1.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культуры вакцинного штамма бруцелл, окрасить по Граму, по Козловскому, промикроскопировать, зарисовать. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей. По результатам работы оформить таблицу.

Таблица

| Морфологические свойства <i>Brucella sp.</i> | Культуральные свойства <i>Brucella sp.</i> | Биохимические свойства <i>Brucella sp.</i> |
|---|---|---|
| | | |

Задание. Поставить пробирочную РА, РБП, КР с молоком.

Задание. Ознакомится с биопрепаратами.

Контрольные вопросы: 1. Какой материал направляют в лабораторию для бактериологического исследования на бруцеллез? 2. В чем состоит бактериологическое исследование на бруцеллез? 3. Как ставят биопробу на бруцеллез? 4. Описать методы применяемые для серологической диагностики бруцеллеза. 5. Вакцины против бруцеллеза?

2.25 Лабораторное занятие №25 (2 часа)

Тема: «Возбудитель сибирской язвы»

2.25.1 Цель работы: Изучить лабораторную диагностику сибирской язвы.

2.25.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, готовые приспособления с возбудителем сибирской язвы, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *B. subtilis*, бактериологические петли, биопрепараты.

2.25.3 Описание (ход) работы:

Сибирская язва (*Anthrax*) - зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Болезнь протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и эпизоотии.

Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* - относится к семейству *Bacillaceae*.

Морфология. *Bacillus anthracis* - неподвижная, грамположительная (в молодых и старых культурах встречаются и грамотрицательные клетки), образующая капсулу (в

организме или при культивировании на искусственных питательных средах с большим содержанием нативного белка и CO_2) и спору палочки, размером 1-1,3 x 3,0-10,0 мкм. При температуре ниже 12 и выше 42°C, а также в живом организме или невскрытом трупе, в крови и сыворотке животных споры не образуются. В окрашенных препаратах из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных бактерии располагаются одиночно, попарно и в виде коротких цепочек по 3-4 клетки; концы палочек, обращенных друг к другу, прямые, резко обрубленные, свободные - слегка, закругленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из культур на плотных и жидких питательных средах палочки располагаются длинными цепочками.

Культивирование. *Bacillus anthracis* по способу дыхания относят к факультативным анаэробам, хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Оптимальная температура роста на МПА 35-37°C, в бульоне 32-33°C. При температуре ниже 12 и выше 45°C не растет. Оптимум pH сред 7,2-7,6. На поверхности МПА в аэробных условиях при температуре 37°C 17-24-часовые культуры состоят из серовато-беловатых тонкозернистых с серебристым оттенком, похожих на снежинки колоний, имеющих шероховатый рельеф и характерных для типичных вирулентных штаммов (R-форма). Диаметр колоний не превышает 3-5 мм. На сывороточном агаре и свернутой лошадиной сыворотке в присутствии 10-50% углекислоты колонии гладкие полупрозрачные (S-форма), а также слизистые (мукоидные), тянувшиеся за петлей (M-форма), состоящие из капсулых палочек. В МПБ *Bacillus anthracis* через 16-24 ч на дне пробирки образует рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья (R-форма).

При посеве в столбик желатина на 2-5-е сут появляется желтовато-белый стержень. Культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатина начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка. *Bacillus anthracis* при росте в молоке вырабатывает кислоту и через 2-4 дня свертывает его и пептонизирует сгусток.

Биохимические свойства. Ферменты *Bacillus anthracis*: липаза, диастаза, протеаза, желатиназа, дегидраза, цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза, лецитиназа и др. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу и декстрин. На средах с глицерином и салицином возможно слабое кислотообразование. Арабинозу, рамнозу, галактозу, маннозу, раффинозу, инулин, маннит, дульцит, сорбит, инозит не сбраживает. Утилизирует цитраты, образует ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса - Проскауэра положительная). Выделяет аммиак. Редуцирует метиленовый синий и восстанавливает нитраты в нитриты. Некоторые штаммы образуют сероводород.

Для лабораторного исследования на сибирскую язву направляют ухо павшего животного.

Бактериоскопия. Из патологического материала для микроскопии готовят мазки, часть красят по Граму и обязательно на капсулы по Михину и Ольту. Обнаружение типичных по морфологии капсулых палочек является важным диагностическим признаком. Посев на питательные среды. Исходный материал засевают в МПБ и на МПА (pН 7,2-7,6), инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 18-24 ч, при отсутствии роста их выдерживают в термостате еще 2 суток.

Биологическая проба. Осуществляется на белых мышах, морских свинках, кроликах, одновременно с посевом материала на питательные среды. Белых мышей заражают подкожно в заднюю часть спины (по 0,1-0,2 мл), морских свинок и кроликов - под кожу в область живота (по 0,5-1,0 мл). Мыши погибают через 1-2 сут, морские свинки и кролики - через 2-4 сут. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови сердца, селезенки, печени и инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Идентификация. Возбудителя сибирской язвы следует дифференцировать от сапрофитных бацилл: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и *B. subtilis* на основе главных и

дополнительных признаков. К главным признакам относятся патогенность, капсулобразование, тест «жемчужного ожерелья», лизабельность фагом, иммунофлюоресцентный тест. Дополнительными являются подвижность, отсутствие гемолиза, лецитиназная активность, образование фосфатазы.

Серологическое исследование. Для обнаружения сибиреязвенных антигенов при исследовании кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала, а также свежего патологического материала и серологической идентификации выделенных культур применяют реакцию преципитации по Асколи. В качестве серологического теста, главным образом для изучения антигенного спектра *Bacillus anthracis*, применяют реакцию диффузионной преципитации (РДП). Используют РИФ, ИФА.

Биопрепараты. Живая вакцина против сибирской язвы из штамма № 55, ассоциированная живая жидкую вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота, лечебно-профилактическая сибиреязвенная сыворотка.

Работа.

Задание. Промикроскопировать готовые мазки с *Bacillus anthracis*, зарисовать. Приготовить мазки из культур *B. subtilis*, окрасить их по Граму, промикроскопировать. Описать колонии *B. subtilis*, заполнить протокол.

Таблица

| Форма | Диаметр, мм | Цвет | Поверхность | Профиль | Край | Структура | Консистенция | Запах |
|-------|-------------|------|-------------|---------|------|-----------|--------------|-------|
|-------|-------------|------|-------------|---------|------|-----------|--------------|-------|

Контрольные вопросы: 1. Описать правила взятия патологического материала при подозрении на сибирскую язву? 2. Какие методы применяют для бактериологической диагностики сибирской язвы? 3. Охарактеризовать морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B. anthracis*. 4. На чем основана дифференциация *B. anthracis* от сапрофитных спорообразующих аэробов? 5. Как идентифицируют возбудитель сибирской язвы при помощи сибиреязвенного бактериофага? 6. Что такое феномен «жемчужного ожерелья»? 7. Какие серологические методы применяют для обнаружения сибиреязвенного антигена в исследуемом материале?

2.26 Лабораторное занятие №26 (2 часа)

Тема: «Возбудители клостридиозов»

2.26.1 Цель работы: Изучить принципы лабораторной диагностики клостридиозов.

2.26.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, готовые микропрепараты, бипрепараты, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *C. perfringens*, пастеровские пипетки, биопрепараты.

2.26.3 Описание (ход) работы:

Эмфизематозный карбункул - острая неконтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся развитием крепитирующих отеков в массивных группах мышц, хромотой и быстрой гибелью животных.

Возбудитель эмфизематозного карбункула - *C. chauvoei*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика эмкара основана на результатах бактериологического исследования.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего очага. Пораженный участок разрезают в глубину и из средней части мышцы отбирают кусочки ткани размером 3 см³. При вскрытии трупа берут также кусочки печени и селезенки, кровь сердца. Материал для лабораторного исследования отбирают не позднее чем через 4 ч после гибели животного. В жаркое время года материал консервируют стерильным 30%-м водным раствором глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Грамположительные, полиморфные, спорообразующие, капсулу не образуют; подвижны.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Культивирование в среде Китта-Тароцци, и глюкозо-кровяной агар в чашках (агар Цейссlera). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 24-48 часов.

Культуральные свойства. На глюкозо-кровяного агара Цейссlera вырастают круглые, в виде перламутровой пуговицы или в форме виноградного листа, плоские, с ровным краем и приподнятым центром колонии, окруженные зоной прозрачного гемолиза; на жидких средах – пышный рост с газообразованием и легким помутнением.

Биохимические свойства: синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатин; коагулирует молоко; индол не образует; ферменты каталазу и лецитиназу не вырабатывает; ферментирует сахарозу и не сбраживает салицин.

Биопроба: заражают морских свинок.

Столбняк. Острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое токсином микробы *C. tetani*. Характеризуется повышенной возбудимостью и судорожными сокращениями мускулатуры тела, приводящими к асфиксии, развивается в результате попадания спор возбудителя в раны. К возбудителю восприимчивы все виды домашних животных, особенно чувствительны лошади. Болезнь может возникнуть после родовых травм, кастрации, обрезания хвостов или пуповины у новорожденных, если при этих операциях были нарушены правила асептики и антисептики.

*Возбудитель столбняка - *C. tetani*, род Clostridium.*

В лабораторию для исследования направляют кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, гной, выделения из ран. При генерализации процесса возбудитель можно обнаружить во внутренних органах, поэтому берут от трупа кусочки печени и селезенки массой по 20-30 г и 10 мл крови. При возникновении столбняка вследствие родов или аборта направляют выделения из влагалища и матки, а при подозрении - труп новорожденного животного.

Микроскопия. Микрокартина в мазке, окрашенном по Граму: тонкая палочка с закругленными концами, длиной 4 -8 мкм, шириной 0,4 - 0,6 мкм; грамположительные, полиморфные; спора на концах бактериальной клетки, придающая ей форму барабанной палочки; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. Китта-Тароцци, в МПБ, на МПА и глюкозо-кровяной агар в чашках (агар Цейссlera).

Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 36-38°C; срок культивирования 24-36 часов.

Культуральные свойства. На глюкозо-кровяного агара Цейссlera вырастают нежные беловато-серые колонии с отростками и приподнятым центром, иногда в виде мелких круглых, напоминающих капельки росы; на жидких средах – интенсивное равномерное помутнение с незначительным газообразованием в виде единичных пузырьков.

Биохимические свойства: не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты; могут ферментировать глюкозу; вызывают медленную ферментацию протеинов и пептонов до аминокислот.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок. Биопробу проводят для обнаружения токсина в патологическом материале и культуре.

Серологическая диагностика. Применяют реакцию нейтрализации и непрямой гемагглютинации.

Возбудитель ботулизма - *Clostridium botulinum* - вызывает остропротекающий кормовой токсикоз. Болезнь развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризует поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Материал для исследования: кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного

Микроскопия. В мазках, окрашенных по Граму наблюдаются палочки с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм, располагающиеся одинично или парами; грамположительные, полиморфные; образуют споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. В среде Китта-Тароцци на глюкозо-кровяном агаре в чашках (агар Цейссlera). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 48-74 часа;

Культуральные свойства. На кровяном МПА – колонии крупные с корневидными отростками и зоной гемолиза; на жидких средах – помутнение среды с газообразованием, характерный запах прогорклого масла.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок, ставится РН.

Работа.

Задание. Приготовить мазки из культур клостридий, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать. Описать культуральные свойства клостридий.

Контрольные вопросы: 1. Охарактеризовать возбудителя эмфизематозного карбункула. 2. Какая реакция используется для определения типа токсина возбудителя ботулизма?

2.27 Лабораторное занятие №27 (2 часа)

Тема: «Возбудители микотоксикозов»

2.27.1 Цель работы: 1. Ознакомить студентов с характеристикой микотоксинов, вызывающих микотоксикозы, грибами-продуцентами этих токсинов и методами исследований для постановки диагноза на микотоксикозы.

2.27.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, пробирки, пипетки, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, чашки Петри с культурами грибов.

2.27.3 Описание (ход) работы:

Микотоксикозы. Болезни животных и человека; характеризуются отравлением, которое возникает при поедании кормов (пищи), содержащих токсические продукты жизнедеятельности микроскопических грибов-плесеней - микотоксины (от греч. *mykes* - гриб и *toxinum* - яд). Известно около 250 видов различных микроскопических грибов, производящих 100 токсических метаболитов. Природными субстратами грибов-продуцентов микотоксинов служат разнообразные сельскохозяйственные культуры. К микотоксинам чувствительны почти все виды домашних, диких животных, птицы и рыбы. Наименование микотоксикоза происходит от названия токсина или гриба-продуцента. При диагностике микотоксикоза наибольшее внимание уделяют обнаружению токсина,

поскольку гриб-продуцент в ряде случаев к моменту исследования погибает и, кроме того, один и тот же микотоксин могут синтезировать различные виды грибов.

Лабораторная диагностика микотоксикозов основана на результатах токсико-биологических, органолептических, микологических и физико-химических исследований.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы всех кормов, входивших в суточный рацион животного в течение одного месяца до проявления болезни, а также остатки кормов из кормушек, содержимое желудочно-кишечного тракта павших животных и др. Отбор средних проб корма проводят ветеринарные и зооинженерные специалисты с представителями предприятий. Отобранные среднюю пробу делят на две части, упаковывают в чистые сухие стеклянные банки объемом 2-3 л, герметически закрывают и пломбируют. Одну часть отправляют в лабораторию, другую хранят в хозяйстве в течение одного месяца в условиях, предотвращающих порчу или вторичное загрязнение. В документе указывают цель исследования, вид кормового средства, назначение, массу всей партии, место отбора пробы, основные клинические признаки у больных животных. Прилагают копию акта вскрытия трупов (при гибели животных), копию экспертизы ветеринарной лаборатории об исключении инфекционных болезней и отравлений животных химическими или растительными ядами (если такие исследования были проделаны лабораторией).

Органолептическое исследование. Определяют внешний вид, цвет, запах корма, выявляют признаки, отличающие дефектный корм от доброкачественного (изменение цвета; затхлый, плесневелый или гнилостный запах; наличие на поверхности корма мицелия гриба и др.). О санитарном качестве зерна можно косвенно судить по цвету и состоянию зерновых оболочек.

Токсикологическое исследование. Проводят на различных биологических моделях: кроликах, аквариумных рыбках гуппи породы Винер, белых мышах или сельскохозяйственных животных.

На кроликах ставят кожную пробу. К 50 г измельченного корма добавляют 150 мл диэтилового эфира (эфир для наркоза) или ацетона. Смесь встрахивают при комнатной температуре с помощью шуттль-аппарата 3 ч. Экстракт фильтруют и выпаривают до полного исчезновения запаха. Налет, оставшийся на стенках чашки, смывают небольшим количеством эфира и используют для биопробы, которую ставят на кроликах массой 2-2,5 кг. Предварительно у кролика в области бедра, лопатки или бока выстригают участок кожи 6 см². Пигментированная или с признаками шелушения кожа непригодна для исследования.

На одном кролике можно ставить не более четырех проб. На выстриженный участок кожи кролика наносят стеклянной лопаткой половину экстракта и легко втирают его. При восковидной консистенции экстракта его предварительно подогревают. Часть участка оставляют свободной от экстракта как контрольную. Через 24 ч наносят оставшийся экстракт. Чтобы предупредить его слизывание, кролику надевают воротник (не менее чем на три дня). Учет проводят на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают вести наблюдение в течение 3...5 дней в зависимости от реакции, после чего дают окончательную оценку: а) корм нетоксичный — отсутствуют воспалительная реакция и изменения на коже; б) корм слаботоксичный — шелушение кожи, отечность, болезненность, незначительное утолщение кожи с образованием отдельных корочек; в) корм токсичный — резкая гиперемия, отек, утолщение кожи, болезненность, появление язвы и струпа.

В качестве дополнительного теста определяют токсичность кормов на аквариумных рыбках. Методика основана на извлечении микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов, экстракции хлороформом и исследовании на рыбках гуппи. В раствор экстракта помещают 5 рыбок независимо от пола и возраста. Ведут наблюдение в течение 24-30 ч. Оценка степени токсичности корма: а) нетоксичный — при

гибели не более одной рыбки в течение 24 ч; б) слаботоксичный — при гибели 2-4 рыбок; в) токсичный — при гибели всех 5 групп за тот же отрезок времени.

Методика определения токсичности корма на белых мышах основана на извлечении токсических веществ из жмыхов, кормовых дрожжей ацетоном и введении концентрированного экстракта однократно в желудок мышам массой 20-25 г. Животных наблюдают в течение 3 сут, не ограничивая их в корме и питье. Оценка результатов корма: а) нетоксичный — мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений нет; б) слаботоксичный — мыши живы, при вскрытии у убитых обнаруживают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое; в) токсичный — гибнут все мыши (или одна), на вскрытии павших или убитых устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто дегенерацию тканей печени, почек или кровоизлияние в паренхиматозных органах. Если токсичность корма не выявлена всеми перечисленными методами, подозрительные корма скармливают лабораторным животным (цыплятам, утятам, голубям, белым мышам, морским свинкам, кроликам) или животным тех видов, которые болели в хозяйстве.

Микологический анализ. Включает в себя выделение из кормов и идентификацию грибов-продуцентов микотоксинов. С этой целью из кормов делают посевы в чашки Петри с агаром Чапека, сусло-агаром или в жидкую среду Билай. Грубые корма высеваются во влажные камеры со средой Ван—Итерсона. Перед посевом агар расплавляют в водяной бане, после охлаждения до 45...50 °С в него для подавления роста сопутствующей микрофлоры добавляют антибиотики (пенициллина $5 \cdot 10^4$ ЕД/л и стрептомицина 10^5 ЕД/л среды). Для приготовления влажной камеры со средой Ван—Итерсона на дно чашки Петри кладут слой ваты с кружком фильтровальной бумаги по диаметру чашки и стерилизуют в сушильном шкафу. Перед посевом на фильтровальную бумагу наливают среду Ван—Итерсона до увлажнения бумаги, не создавая избытка влаги (около 5 мл).

Для выделения грибов из зерен последние раскладывают по поверхности фильтровальной бумаги по 10 штук, чтобы они не соприкасались одно с другим. Посевы культивируют при 22-25°C 3-10 дней до образования характерного спороношения, после чего проводят макро- и микроскопическое исследование культур грибов с целью идентификации.

При макроскопическом исследовании учитывают различные признаки выросших колоний: цвет, форму, консистенцию, характер роста, образование склероциев, выделение пигмента, степень развития воздушного мицелия. Затем готовят препараты «раздавленная капля». Микологическим крючком или препаровальной иглой берут частицы мицелия (желательно со спороношением из молодых культур с периферии, от старых — из центра колоний) и вносят их в фиксирующую жидкость. Другой иглой материал расправляют на предметном стекле и покрывают покровным стеклом, слегка прижимая его. Микроскопируют с помощью малого объектива (x8, x40) или в иммерсионной системе при слегка спущенном конденсоре. Токсичность культур определяют методом кожной пробы на кроликах или другим способом.

Физико-химический анализ. Его цель — качественное и количественное определение микотоксинов в кормах и других материалах с помощью различных методов — люминесцентного анализа, хроматографии и т.д..

При оценке результатов анализов необходимо учитывать данные всех исследований, а в случае постановки диагноза — клинические признаки и характер патологоанатомических изменений.

Работа.

Задание. Изучить культурально-морфологические свойства грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*.

Задание. Составить схему лабораторного исследования на микотоксины.

Контрольные вопросы: 1. Перечислить основные отличия микозов от микотоксикозов. 2. Морфологические и культуральные свойства возбудителей микотоксикозов. 3. Какой материал отправляют в лабораторию и в чем состоит его исследование на выявление микотоксинов? 4. Как ставят биопробу при диагностике микозов и микотоксикозов? 5. На каких питательных средах культивируют возбудители микозов и микотоксикозов?