

**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: заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Систематика и морфология микроорганизмов.....	3
1.2 Лекция № 2 Физиология микроорганизмов	6
1.3 Лекция № 3 Понятие инфекции. Патогенность и вирулентность. Виды ин- фекции.....	10
1.4 Лекция № 4 Возбудители сальмонеллёза.....	15
1.5 Лекция № 5 Возбудители бруцеллё- за.....	22
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	30
2.1 Лабораторная работа 1 (ЛР-1) Систематика и морфология микроорганизмов.....	31
2.2 Лабораторная работа 2 (ЛР-2) Разнообразие питательных сред. Культивирование и методы учёта численности микроорганизмов.....	32
2.3 Лабораторная работа 3 (ЛР-3) Техника посева и методы культивирования аэро- бов и анаэробов.....	33
2.4 Лабораторная работа 4 (ЛР-4) Возбудители стафилококкозов.....	37
2.5 Лабораторная работа 5 (ЛР-5) Возбудитель колибактериоза.....	40
2.6 Лабораторная работа 6 (ЛР-6) Возбудитель рожи свиней.....	43
3. Методические указания по проведению практических занятий	47
3.1. Практическое занятие №1 (ПЗ-1) Серологические реакции. Оборудование для постановки серологических реакций.....	47

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа)

Тема: «Систематика и морфология микроорганизмов».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Обязательные компоненты бактериальной клетки.
2. Необязательные компоненты бактериальной клетки.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Обязательные компоненты бактериальной клетки.

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 эндоспores.

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 его долю приходится до 90% сухой массы клеточной стенки), включающих полимеры тейхоевых кислот, которые являются производными рибитола или глицерина. Они пронизывают пептидогликан насквозь или находятся на его поверхности. Выделено 2 типа кислот: *рибиттейхоевые* 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.

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 устранении 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.

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, пермеазы)).

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

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.

2. Необязательные компоненты бактериальной клетки.

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 внехромосомных 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.

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.

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 S, 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 нежгутиковых образований на поверхности клетки, синоним «фимбрий». 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 фимбрины, которые организованы в спиральные структуры. Пили часто расположены перитрихально по поверхности клеток, но иногда могут быть локализованы на одном конце клетки.

Пили подразделяются на 2 типа: пили 1 типа обуславливают 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.

Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно запасные вещества, называемые также **тельцами включения** (полисахариды, полифосфаты, сера и т.д.). Все за-

пасные вещества присутствуют в клетке в химически инертной форме. Такое состояние препятствует нарушению осмостаза клеточного содержимого. 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.

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 дезинфектантов, 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 прорастания 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 окрашенного остального содержимого клетки. Но есть специальные методы дифференциальной окраски спор.

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.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Физиология микроорганизмов».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Химический состав прокариотной клетки.
2. Типы питания микроорганизмов. Поглощение разных веществ клетками.
3. Дыхание микроорганизмов.
4. Рост и размножение микроорганизмов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Химический состав прокариотной клетки.

Бактериальные клетки содержат от 70 до 85 % воды. Следовательно, сухая биомасса составляет 15... 30 % общей клеточной массы.

Вода имеет огромное значение в жизни микроорганизмов, питательные вещества могут попасть в клетку только в растворенном до отдельных молекул состоянии. Часть воды в клетке находится в связанном состоянии с белками, углеводами и другими веществами и входит в клеточные структуры. Остальная вода находится в свободном состоянии и служит дисперсной средой для коллоидов и растворителем различных органических и минеральных соединений, образующихся в клетке при обмене веществ.

Сухая биомасса клетки — это в основном полимеры.

Белки. Содержание белков в клетке составляет около 50%. У разных микроорганизмов содержание белков в процентах следующее: у бактерий 40...80, у дрожжей 40...60, у грибов 15...40. Белки бывают простые — альбумины, глобулины; и сложные, в состав которых входит белковая и небелковая части (липопротеиды).

Белки выполняют две основные функции:

1. входят в состав всех мембран клетки;
2. играют роль ферментов — биохимических катализаторов, которые обуславливают, направляют и ускоряют почти все химические реакции, происходящие в живой клетке.

Среди белков есть и такие, которые убивают жизнь, — токсины. Бактериальные токсины наиболее ядовитые.

Некоторые микроорганизмы синтезируют большое количество белков в клетке — до 80%. Такие микроорганизмы рассматриваются как возможные продуценты кормового и пищевого белка. Промышленное производство таких белков рентабельно, так как микроорганизмы быстро растут независимо от времени года и погоды. В качестве сырья для их роста используются отходы пищевой и других отраслей промышленности. Продуцентами могут быть дрожжи, бактерии и водоросли, особенно цианобактерии.

К настоящему времени выделено и изучено около 1000 ферментов в чистом виде. Все они подразделены по правилам номенклатуры ферментов на шесть классов:

1-й класс — оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции;

2-й класс — трансферазы, которые переносят группы атомов с помощью специфических переносчиков, действующих как коферменты;

3-й класс — лиазы — катализируют отщепление отдельных химических групп.

4-й класс — изомеразы, которые катализируют превращения химических соединений в их изомеры;

5-й класс — лигазы — катализируют реакции синтеза сложных органических соединений из более простых; реакции идут с затратой энергии, получаемой из АТФ;

6-й класс — гидролазы, которые катализируют гидролитическое расщепление.

Применение ферментов. Применение в пищевой и легкой промышленности ферментов, полученных из микроорганизмов, позволяет значительно интенсифицировать технологический процесс, повышает выход и улучшает качество готовой продукции.

Углеводы составляют от 12 до 28%. Основная функция — источник энергии.

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). В клетке содержится от 3 до 4 % ДНК и от 10 до 20 % РНК. В молекуле ДНК закодирована вся наследственная информация вида. ДНК сосредоточена в нуклеоиде прокариотной клетки. Часть ДНК находится в плазидах. РНК сосредоточена главным образом в рибосомах (до 80 %), синтезирующих белок, и в цитоплазме.

Липиды. В клетке образуется до 10 % липидов. Некоторые дрожжи и плесневые грибы синтезируют до 40...60 % липидов. Липиды входят в состав цитоплазматической мембраны и в состав всех других мембран. Могут находиться в цитоплазме в виде гранул.

Функция – запас резервных веществ, поддерживают структуру микробных клеток, придают устойчивость.

2. Типы питания микроорганизмов. Поглощение разных веществ клетками.

Питание – физико-химические эндотермические процессы, связанные с поступлением внутрь клетки питательных субстратов и обеспечивающие синтез компонентов, необходимых для метаболизма, роста и размножения бактерий. Метаболизм – обмен веществ в микробной клетке – включает два взаимосвязанных процесса: ассимиляцию (анаболизм – питание) и диссимиляцию (катаболизм – дыхание и брожение).

По типам питания все живые существа подразделяются на несколько групп в зависимости от природы источников углерода и энергии, а также донора электронов. У микроорганизмов представлены все типы метаболизма, к тому же они могут переключаться с одного типа питания на другой в зависимости от условий.

Организмы, использующие в качестве источника углерода в процессе анаболизма CO_2 – автотрофы (самопитающиеся), а использующие готовые органические вещества – гетеротрофы. Гетеротрофные микроорганизмы могут быть паразитами – используют в качестве источника органических соединений субстраты живого организма и сапрофитами – не зависят от других организмов, но нуждаются в готовых органических соединениях.

В зависимости от источника используемой энергии автотрофы подразделяются на фотоавтотрофы – использующие энергию Солнца и хемоавтотрофы – микроорганизмы, которые питаются неорганическими веществами путем использования энергии химических реакций. Они окисляют аммиак, сероводород и другие вещества, содержащиеся в воде, почве, других средах. Так, серобактерии ассимилируют неорганические соединения за счет энергии, высвобождающейся при окислении сероводорода и превращении его в чистую серу.

По отношению к источнику азота микроорганизмы делятся на прототрофные – способны синтезировать все необходимые им органические соединения (углеводы, аминокислоты и др.) из глюкозы и солей аммония и ауксотрофные, не способны синтезировать какое-либо из указанных соединений, ассимилируют их из окружающей среды или организма хозяина.

Некоторые микроорганизмы, не синтезирующие какие-либо вещества, должны получать их в готовом виде. Эти вещества, относящиеся к различным классам химических соединений, получили название факторов роста, ими могут быть аминокислоты, пурины, пиримидины и их производные, витамины, липиды и т. д.

Потребность того или другого микроорганизма в определенных ростовых факторах является стабильным признаком, который используется для дифференциации и идентификации бактерий, а также при изготовлении питательных сред для лабораторных и биотехнологических целей.

Первой стадией метаболизма того или иного вещества является его проникновение в клетку. У большинства микроорганизмов в клетку проникают вещества, растворённые в воде. Для микроорганизмов характерен голофитный тип питания: клеточная стенка микроорганизмов, ЦПМ являются существенным препятствием для проникновения в клетку высокомолекулярных веществ. Поэтому такие соединения сначала расщепляются вне клетки на олиго- и мономеры соответствующими гидролазами. У Г- м/о эти ферменты расположены либо на наружной стороне ЦПМ, либо в периплазматическом пространстве. Высокомолекулярные вещества проникают в их периплазму с помощью белков-поринов в наружной мембране.

Существует несколько принципиально различных способов поступления веществ в клетку:

1. Путём пассивной диффузии – все незаряженные молекулы по градиенту концентрации, не требуют затрат энергии.

2. Путём облегчённой диффузии – при участии специфических белков-переносчиков по градиенту концентрации.

3. Путём активного транспорта – против градиента концентрации, с затратой метаболической энергии. Так в клетку поступает большинство питательных веществ.

3. Дыхание микроорганизмов.

Дыхание – физико-химические экзотермические процессы, связанные с биологическим окислением субстрата кислородом или путём дегидрирования.

Под дыханием понимается цепь последовательных ОВР, сопровождающихся переносом электронов от окисляющейся системы к восстанавливающейся. Энергия аккумулируется в молекулах АДФ и АТФ, в макроэргических связях. Эти молекулы концентрируются в мезосомах.

По своему отношению к кислороду все микроорганизмы подразделяются на аэробы, растущие в присутствии O_2 , и анаэробы, способные расти в его отсутствие.

Аэробное дыхание – это процесс, при котором последним акцептором электронов, протонов, H^+ является молекулярный кислород.

Анаэробное дыхание – осуществляется без участия кислорода. Подразделяется на собственно анаэробное дыхание и брожение.

При собственно анаэробном дыхании акцептом H^+ являются неорганические вещества. При брожении – органические вещества. Брожение открыл Л. Пастер.

По типу дыхания различают следующие группы микроорганизмов:

1. Облигатные (безусловные) аэробы.
2. Микроаэрофилы.
3. Факультативные анаэробы.
4. Облигатные.

При культивировании анаэробов от кислорода воздуха избавляются несколькими путями:

1. Механический – культивирование в анаэроостате или эксикаторе. Анаэроостат – это металлическая ёмкость, снабжённая манометром и краном для откачивания воздуха. Удаляют кислород путём отсасывания воздуха из анаэроостата, заменяя сжатым оксидом углерода из баллона.

Для культивирования микроаэрофилов используют эксикатор, в который помещают пробирки или чашки Петри с посевами и свечу. Свечу зажигают, закрывая крышку эксикатора. Пламя затухает по мере выгорания кислорода, и снижение его содержания достаточно для роста микроаэрофилов.

2. Химический способ удаления кислорода предполагает использование смесей химических веществ, например смесь пироголола и 10% NaOH.

3. Биологический – чашки Петри заливаются плотной питательной средой. После застывания узкую полоску среды убирают по диаметру чашки. На одну часть питательной среды засевают аэробы, на другую – анаэробы. Чашку плотно закрывают, а щели заливают парафином или воском.

4. Рост и размножение микроорганизмов.

Рост – синтез компонентов клетки и увеличение её размеров. Размножение – увеличение количества бактериальных клеток в популяции. Достигнув определённых размеров, микробная клетка начинает делиться. Делится простым поперечным делением. Процесс деления состоит из ряда этапов: сначала формируется в средней части клетки поперечная перегородка, которая состоит в начале из ЦПМ. Нити ДНК расплетаются и фиксируются на ЦПМ и мезосомах. По мере роста ЦПМ эти нити растягиваются и формируют 2 клетки. Каждая нить достраивает комплементарную. Скорость размножения у разных микроорганизмов разная. Например, *E. coli* делится каждые 20-30 минут, но скорость деления микробной клетки в 100 раз больше, чем у соматической.

Общую закономерность роста и размножения бактериальных популяций принято изображать графически в виде кривой, которая отражает логарифм числа живых клеток от времени. На этой кривой 5 фаз:

1. Лаг-фаза или фаза покоя (lag - запаздывание) – в этот период роста и размножения не происходит, а происходит адаптация к окружающей среде, выработка нужного набора ферментов. В среднем длится 4-5 часов.
2. Логарифмическая фаза – фаза активного роста и размножения клеток. Размножение идёт в геометрической прогрессии. Продолжительность фазы – 5-6 ч.
3. Стационарная фаза – количество вновь образующихся клеток равно количеству отмирающих. Длится около 2 часов.
4. Фаза отмирания развивается, так как истощается питательная среда, pH становится меньше 7, накапливаются продукты метаболизма.
5. Фаза сохранения популяции - в эту стадию у спорообразующих микроорганизмов происходит активное спорообразование, образуются покоящиеся формы бактерий.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

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

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Понятие инфекции, инфекционного процесса, болезни.
2. Свойства возбудителя, способствующие возникновению инфекционной болезни. Патогенность и вирулентность.
3. Виды инфекции.

1.3.2 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 определённых 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 микроба 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 присущи 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 микробом и организмом.

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

Инкубационный период — определенный промежуток времени от момента проникновения микроба 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 ящуре — 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 размножиться, распространиться 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 грамотрицательных 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 – поражаает нервную систему. Например, тетанолизин столбнячного микроба, ботулинический нейротоксин.

2.2.4. Энтеротоксины – вызывают расстройство ЖКТ, диарею.

2.2.5. Некротоксин – вызывает омертвление ткани, тормозит терморегуляцию, понижает температуру тела.

2.3. *Эндотоксины* – образуются в результате распада микробной клетки (ЛПС, пептидогликан, тейхоевые и липотейхоевые 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 вглубьлежащие ткани патогена (*S. aureus*, бруцеллы, клостридии),
- нейраминидаза расщепляет сиаловые кислоты оболочек клеток, разжижает носовой секрет (пастереллы, вибрионы),
- фибринолизин растворяет сгустки фибрина (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 анти-лизоцимная 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 **аутоинфекции**.

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 развиваться 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 развиваться 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 развившегося 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 (бруцеллез, 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 (Ку-лихорадка, 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 инфекций кожных покровов и слизистых оболочек передаются через предметы обихода, прямым контактом, например посредством укуса (бешенство) или половым путем (кампилобактериоз).

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Возбудители сальмонеллёза.»

1.4.1 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.
4. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя туберкулёза.
5. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
6. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика туберкулёза.

1.4.2 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 аборт. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

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 (suipestifer) - у поросят.

S. typhisuis - у свиней.

S. typhimurium - у водоплавающей птицы.

S. abortus equi - аборт 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 °C, 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 МПА, МПБ, 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 мочевины, 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-антигенов сальмонеллы объединены в серологические группы, которые обозначены прописными буквами латинского алфавита: А, В, С, D и др. Всего установлено свыше 60 серологических групп. В лабораториях используют диагностическую схему Кауфмана-Уайта, построенную на анализе О- и Н-антигенов. В соответствии с особенностями антигенной структуры каждая группа объединяет большое количество сероваров, расположенных в алфавитном порядке по обозначению первой фазы их Н-антигена. При этом первая фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (a, b, c, d, e и т. д.), вторая фаза - арабскими цифрами или латинскими буквами (1, 2, 5, 6; e, d 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 суточными культурами на плотной питательной среде.

2. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика. Иммуитет 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, тетрациклинам, левомицетину, стрептомицину, менее чувствительны к сульфаниламидным и нитрофурановым препаратам.

Патогенность. Патогенные свойства сальмонелл обуславливают 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 аэрогенный, 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 высевает 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.

Иммуитет и средства специфической профилактики. Иммуитет 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) по-

росят готовят из трех штаммов в соотношении: *S. choleraesuis* — 50 %, *S. typhimurium* — 25 %, *S. dublin* — 25 %.; формолтиомерсальную 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 формолтиомерсальную поливалентную против сальмонеллеза овец; поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа и колибактериоза телят, ягнят, овец и птиц.

4. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя туберкулеза.

По оценкам экспертов ВОЗ, треть населения земли инфицирована туберкулезом. Из 17 доклада ВОЗ, озвученного в преддверии дня борьбы с туберкулезом (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 туберкулеза (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 (бугорков), 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 послеубойном 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 выраженном 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 (*Myc. tuberculosis*), животных (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. 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 1,5–4х0,4 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 селективных 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 глициринофильность. 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, глицериновы картофель). На плотных средах микобактерий 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; уреазы - мочевины, перигалаза - углеводы, каталаза - перексид водорода; протеолитические ферменты (протеазы) - 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 токсинообразование. 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 за-

пораженного макроорганизма, нарушая процессы дыхания и фосфорилирования. АЛА способствует длительному персистированию в организме.

Антигенная структура. Все без исключения микобактерии содержат полисахариδο-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 полисахариδο-липоидный комплекс, т. е. полный антиген.

5. 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°С в течение 1 ч, при 65°С - через 15 мин, при 70-80°С - через 5-10 мин. В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9-10 суток, а в скисшем 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 метасоля, растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция и взвеси, содержащие не менее 5 % активного хлора при экспозиции 3 ч; 1% раствор глутарового альдегида, 8% эмульсия феносмолина 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 сосу-

дов 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 обызвествляются 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.

6. Лабораторная диагностика. Иммуитет 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 овоидных 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: ниаиновый 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 пурифицированный дериват - ППД). ППД был предложен М. А. Линниковой для медицинской практики. В ветеринарии используют стандартизированный 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

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Возбудители бруцеллёза. »

1.5.1 Вопросы лекции:

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

1.5.2 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, проявляющаяся абортами, 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). Диагностировать болезнь у таких животных можно лишь с помощью серологического или аллергического методов исследования. У беременных животных всех видов бруцеллез характеризуется абортами 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 гнойно-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*.

В настоящее время род *Brucella* включает в себя шесть видов: *B.abortus* - возбудитель бруцеллёза крупного рогатого скота; *B.melitensis* – возбудитель бруцеллеза овец и коз; *B.suis* - свиней; *B.canis* - собак; *B. neotomae* - кустарниковых крыс; *B.ovis* - инфекционного эпидимита 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 бруцеллёза имеют бруцеллы первых трёх видов и первых биоваров.

Морфология. Бруцеллы - мелкие граммотрицательные 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%) CO₂. 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 кислоты 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, фосфатазу.

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 во внешней среде. Бруцеллы характеризуются большой устойчивостью к действию факторов окружающей среды. Они длительно сохраняют жизнеспособность при низкой температуре. В почве, моче, испражнениях животных, больных бруцеллёзом, в навозе, сеной 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 бруцелл 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 *Bz. 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 обуславливают способность возбудителя проникать в ор-

ганизм 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 хронический сепсис – 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, абортированным плодом, околоплодной жидкостью, влагалищной слизью. У животных выражено нарушение вынашивания плода, возбудитель содержится в плаценте, в околоплодных водах, т.к. в плаценте имеется белок *эритролит*, который является хорошим субстратом для роста бруцелл.

3. Лабораторная диагностика. Иммуниет и иммунопрофилактика бруцеллёза.

Используется бактериологический, серологический, биологический методы.

Материалом для бактериологического исследования служат: абортированный 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-антигеном, 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 бруцеллёзе лежит клеточный иммунитет. Важную роль играет фагоцитоз и состояние аллергии. Обезвреживание бруцелл происходит при участии антител – опсоинов, 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 бруцеллёза обеспечивается проведением комплекса общих и специфических мероприятий ветеринарной службой. Вакцинацию проводят живой ослабленной бруцеллёзной вакциной (для крупного рогатого скота – из штамма 82 *Br. abortus*, для мелкого рогатого скота – из штамма Рев-1 *Br. melitensis*), которую вводят животным планово.

4. 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 изготовил 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 пенная 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.

Абортивное 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 локализованно, в форме ангины или фарингита, выражающегося сильным опуханием 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 нескрытых трупах, в живом организме, при t ниже 12°C и выше 45°C — 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 $35 - 37^{\circ}\text{C}$ и pH 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 ложносибирезвенных бацилл.

Токсинообразование. 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 антигена (РА); летального (LF) и эдематогенного фактора (EF).

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

5. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Вегетативные формы микроба малоустойчивы. В мягких тканях не вскрытого трупа они разрушаются под действием протеолитических ферментов через 7 дней. При 60 °С погибают через 15 мин, при 100 °С – мгновенно, под действием прямых лучей солнца – через несколько часов, быстро гибнут при воздействии общепринятыми дезинфицирующими средствами. При низкой температуре (-10 °С) вегетативные клетки выживают 24 дня, в замороженном мясе (при $t -15^{\circ}\text{C}$) выживают до 15 дней. Споры возбудителя сибирской язвы высокорезистентны. Не погибают в разлагающемся трупном материале, десятками лет сохраняются в почве. Сухой жар при 120...140°С убивает их через 2...4 часа, автоклавирование при 120 °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 – контаминированные 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 агрессивные, парализующие фагоцитарную деятельность лейкоцитов и клеток ретикулоэндотелиальной системы, что способствует размножению возбудителя. Важнейшее патогенетическое значение имеют экзотоксин и капсульное вещество бацилл. Наличие капсул предотвращает фагоцитоз, а токсин разрушает клетки, фиксировавшие бациллы.

Действие агрессивных агентов нарушает проницаемость эндотелия сосудов, ухудшает кровообращение, приводит к застою, общей интоксикации организма. В пораженном организме происходит экссудация жидкости в полости и ткани, появляются кровоизлияния. Агрессивные агенты, 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 бактерий. Они размножаются в этих очагах и продуцируют экзотоксин, вызывая явления интоксикации. Затем бактерии проникают в регионарные лимфатические узлы, вызывая геморрагический лимфаденит, а из лимфатических узлов – в кровь. Таким образом, и в этих случаях может развиваться септицемия.

6. Лабораторная диагностика. Иммуитет 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 животного из двух зараженных исходным материалом или полученной культурой с последующим выделением 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 кожных сырых 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 сибиреязвенного 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. Иммуитет, 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. Иммуитет формируется через 10 дней после прививки и сохраняется более 1 года. Разработаны две формы сибиреязвенной 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. Иммуитет 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 сибиреязвенные вакцины нового поко-

ления с получением рекомбинантных штаммов, обеспечивающих формирование более длительного иммунитета.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Систематика и морфология микроорганизмов»

2.1.1 Цель работы: Овладеть методами приготовления микропрепаратов и иммерсионной микроскопии.

2.1.2 Задачи работы:

Овладеть методами приготовления микропрепаратов и иммерсионной микроскопии.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Предметные стекла, бактериологические петли, спиртовки, взвесь бактерий в стерильном физ. растворе, микроскопы, иммерсионное масло, раствор метиленового синего, тушь.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Работа 1.

Задание. Приготовить препараты живых клеток: «раздавленная капля» - грибов, височная капля - подвижных бактерий, «отпечаток» - актиномицетов. Промикроскопировать препараты и зарисовать результат исследования.

Работа 2.

Задание. Приготовить микропрепарат из агаровой культуры.

Для приготовления мазка необходимо взять чистое обезжиренное стекло. На предметном стекле обозначают стеклоглафом место нанесения материала. На обратную сторону стекла от обозначенного места наносят петлей каплю физиологического раствора. В левую руку берут пробирку с агаровой культурой, а в правую - петлю за петледержатель. Петлю обжигают на пламени горелки. Пробку прижимают к ладони 4 и 5 пальцами и медленными вращающими движениями извлекают из пробирки. Край пробирки обжигают. Петлю вводят в пробирку и остужают о стенки. Скользящим движением петлей берут материал и осторожно, не задевая о стенки, извлекают. Пробирку снова обжигают и закрывают пробкой.

В каплю физиологического раствора вносят исследуемую культуру и смешивают петлей до образования слегка мутноватой взвеси. Полученную взвесь равномерно распределяют на поверхности стекла, чтобы диаметр мазка был 1 – 1,5 см. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют, для этого проводят стекло над пламенем горелки три раза, при этом мазок должен быть сверху. Препарат окрашивают фуксином (1-2 мин) или метиленовой синькой (3-5 мин).

Для окраски негативным способом на стекло наносят каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе и смешивают с каплей туши. Препарат высушивают.

Окрашенные препараты рассматривают под микроскопом с использованием масляной иммерсии.

Заполнить таблицу.

Таблица

Позитивный метод окраски		Негативный метод окраски тушью (рис.)
Фуксином (рис.)	Метиленовым синим (рис.)	

Контрольные вопросы: 1. Какие красители наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов? 2. В чем преимущества негативной окраски микроорганизмов? 3. Правила обработки предметных и покровных стекол. 4. Как приготовить препараты живых клеток? 5. Правила приготовления препаратов фиксированных клеток. 6. Каковы цели и способы фиксации?

Материалы и оборудование: предметные стекла (обычные и с лунками), покровные стекла, бактериологические петли, фильтровальная бумага, пипетки, спиртовки, микроскопы, иммерсионное масло, вазелин, растворы красителей, культуры микроорганизмов.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

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

2.2.1 Цель работы: Изучить метод и сущность сложного метода окраски по Граму.

2.2.2 Задачи работы: Изучить метод и сущность сложного метода окраски по Граму.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры бактерий, бактериологические петли, предметные стекла, фильтровальная бумага, спиртовки, микроскопы, красители генциановый фиолетовый и фуксин, раствор Люголя, этиловый спирт 96%, иммерсионное масло, дистиллированная вода

2.2.4 Описание (ход) работы:

Сложные методы окраски бактерий

Окраска микроорганизмов по Граму.

В зависимости от химического состава и строения клеточной стенки прокариоты делятся на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Основные отличия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий схематически изображены на рисунке.

Такое деление связано со способностью бактерий окрашиваться по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. Сущность окраски заключается в том, что при обработке клеток прокариот сначала красителем генциановым фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс, который при последующей обработке спиртом удерживается грамположительными бактериями и вымывается из клеток грамотрицательных бактерий, которые в результате обесцвечиваются. При последующей обработке фуксином они приобретают розово-красную окраску, а грамположительные имеют сине-фиолетовую окраску.

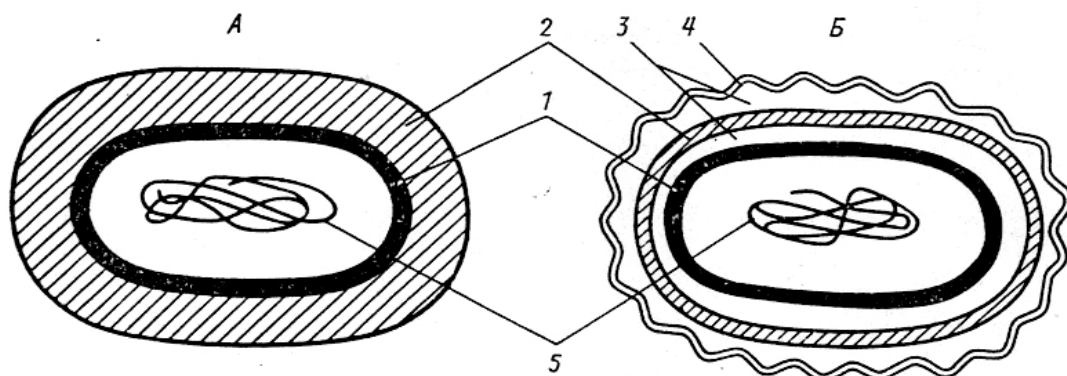


Рис. Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий. 1- цитоплазматическая мембрана; 2- пептидогликан; 3-

периплазматическое пространство; 4- наружная мембрана; 5-ДНК.

Приготовление препаратов бактерий, окрашенных по Граму, включает следующие этапы:

1. Приготовление мазка.
2. Фиксация препарата.
3. Окрашивание препарата генциановым фиолетовым (1-2 мин.).
4. Обработка раствором Люголя до почернения.
5. Обработка 96° этиловый спиртом (0.5-1 мин.).
6. Промывание препарата водой.
7. Окрашивание фуксином (1-2 мин.).
8. Промывание препарата водой.
9. Высушивание препарата.
10. Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный цвет фуксина.

Работа

Задание. Приготовить препарат из смеси грамположительных кокков и грамотрицательных палочек. Окрасить по методу Грама. Рассмотреть окрашенный препарат под микроскопом с иммерсией.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Граму и время их действия	Назначение основных ингредиентов	Результат (рисунок с обозначениями)

Контрольные вопросы: 1. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. 2. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий. 3. Сущность окраски по Граму.

Материалы и оборудование: культуры бактерий, бактериологические петли, предметные стекла, фильтровальная бумага, спиртовки, микроскопы, красители генциановый фиолетовый и фуксин, раствор Люголя, этиловый спирт 96%, иммерсионное масло, дистиллированная вода.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистой культуры»

2.3.1 Цель работы: Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов.
2. Изучить условия культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.
3. Ознакомиться с питательными средами для культивирования анаэробов.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри со стерильными плотными питательными средами, пробирки со стерильным МПА, МПБ, бактериологические петли, спиртовки

2.3.4 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 соединений, 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 посева 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 переменчивы в отношении температур, оптимальных для их роста, но большинство из них мезофиллы, исключение составляют некоторые атипичные микобактерии, возбудители чумы, листерии и лептоспиры (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 остаётся постоянным, микроорганизмы выращивают на по-

верхности 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 материал, 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 - анаэро-статах. Иногда воздух в них заменяют каким-либо другим газом, например CO_2 . Дос-туп 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 расплавлен-ный и остуженный агар с посевным материалом набирают в стеклянные трубочки, кото-рые запаивают с двух концов.

Химические методы заключаются в том, что при культивировании исследуемого ма-териала на плотных средах в эксикатор помещают химические вещества, например пиро-галлол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода. В жидкие пи-тательные среды можно добавлять различные редуцирующие вещества: аскорбиновую или тиогликолевую кислоту.

Биологический метод основан на одновременном культивировании аэробов и ана-эробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закупоренных. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, посеянными 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 сте-рильным вазелиновым маслом. Заметный рост анаэробов (помутнение) может наблюдат-ся 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 по-сева чашки помещают в анаэро-стат. 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 значи-тельного количества биомассы отсевают затем на среду Кита-Тароцци. В качестве источ-ника энергии для анаэробов используют глюкозу, добавление которой в питательную сре-ду обязательно.

При культивировании анаэробов посе-вы исследуемого материала выращивают на специальных средах в анаэробных условиях, исключающих доступ к ним свободного ки-слорода. Питательные среды, используемые для культивирования анаэробов: Шедлер-агар, Шедлер-бульон. Среда Кита-Тароцци – 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.

Анаэробноз создают, используя анаэростат или эксикатор. Анаэростат представляет собой толстостенную металлическую емкость, куда помещают чашки Петри или пробирки с засеянными микроорганизмами. Систем газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и измерять 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 анаэробноза
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.

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Возбудители стафилококкозов»

2.4.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения ферментативной активности микроорганизмов.

2.4.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с методами изучения ферментативной активности микроорганизмов.
2. Изучить принцип идентификации чистой культуры микроорганизмов.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Среды Гиса, тест на расщепление белков, коммерческие тест-системы для изучения биохимических свойств микроорганизмов, определители Берджи.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Изучение ферментативной активности микроорганизмов.

В пределах семейства у представителей разных родов можно обнаружить как общие для семейства, так и специфические для родов наборы ферментов. У микроорганизмов разных видов в пределах одного рода есть общие (родовые) и специфические для отдельных видов ферменты. Таким образом, каждый вид микроорганизмов характеризуется специфическим набором ферментов, поэтому определение ферментного спектра - важнейший этап идентификации микроорганизмов.

О наличии того или иного фермента судят по способности микроорганизмов воздействовать на известный субстрат. Присутствие фермента регистрируют по изменению физического состояния субстрата (разжижение желатины), закислению питательной среды (среды Гисса с углеводами), образованию определенных продуктов метаболизма (индол, сероводород, аммиак) и т.д.

Наиболее распространены следующие методы регистрации ферментативной активности микроорганизмов.

Выявление сахаролитической активности микроорганизмов. В состав дифференциально-диагностических углеводных сред входят различные соединения, которые можно условно назвать сахарами: моносахариды, полисахариды, многоатомные спирты. При утилизации углеводов в качестве конечных продуктов образуются кислоты и газообразные продукты. Соответственно расщепление углевода регистрируют по изменению pH среды и выделению газообразных продуктов. Закисление питательной среды улавливают при помощи различных индикаторов.

Индикатор ВР, входящий в состав сухих сред Гисса, меняет цвет от розового в щелочной среде через серый при нейтральном pH до голубого или ярко-синего в кислой среде.

Индикатор Андрэдэ (кислый фуксин — 0,5 г, 1%-й раствор гидроксида натрия — 16 мл, дистиллированная вода — 84 мл) при закислении дает покраснение среды. В жидких средах Гисса образование газов при утилизации субстрата улавливают при помощи поплавков («газовок») — стеклянных трубочек, запаянных в верхнем конце и помещенных в

пробирки. В «газовках» скапливаются газы, вытесняющие жидкую питательную среду; в полужидких средах Гисса газообразные продукты остаются в толще среды в виде пузырьков.

Ферментация углеводов иногда происходит медленно, поэтому предварительный учет результатов проводят через 24...48 ч, а окончательный - через 10...14 сут инкубирования посевов. Тест с метиловым красным показывает степень закисления среды при расщеплении глюкозы. Метилрот как индикатор срабатывает в диапазоне pH 4,4...6,0. Исследуемую культуру выращивают 2...5 сут в жидкой среде Кларка с глюкозой. Затем на 5 мл среды добавляют пять-шесть капель раствора метилрота. Положительный результат - покраснение среды после внесения индикатора (pH 4,0...5,0).

Протеолитическая активность. Протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и других групп микроорганизмов. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин и другие белки. Для определения такого протеолитического фермента, как коллагеназа, проводят посев культуры уколом на мясопептонную желатину (МПЖ). Разжижение МПЖ отмечают визуально. По характеру роста и форме области разжижения можно судить об отношении данного микроорганизма к кислороду (рис.11). В случае строгого аэробизма разжижение пойдет послойно, начинаясь с поверхности. Менее строгие аэробы вызывают разжижение воронкообразное, факультативные анаэробы - мешковидное разжижение, строгие анаэробы вызывают пузыревидный рост в глубине питательной среды.

Для выявления такого протеолитического фермента, как казеиназа используют молочный агар Эйкмана. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросших по штриху микроорганизмов.

Липолитическая активность. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы обычно высевают на среды, содержащие твины - эфиры жирных кислот и сорбита и 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60 - стеариновую, а твин-80 - олеиновую кислоты.

Обнаружение фермента каталазы. Некоторые микроорганизмы - аэробы в процессе дыхания образуют перекись водорода, являющуюся клеточным ядом. Количество перекиси водорода в культуре никогда не достигает высоких концентраций, так как по мере образования перекись разлагается на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы.

Принципы идентификации микроорганизмов. Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы, например группа № 20 «Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы» или группа № 5 «Факультативно-анаэробные грам-отрицательные палочки». В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в

этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкто либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к био-, серо-, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

Работа 1.

Задание. Ознакомится с тестами, характеризующими ферментативные свойства бактерий.

Работа 2.

Задание. Идентифицировать микроорганизмы с помощью коммерческой тест-системы STAPHYtest16.

STAPHYtest16 предназначен для рутинной идентификации стафилококков и дифференциации их от других родственных грамположительных кокков.

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков в настоящее время фирма Lachema выпускает отдельные тест-системы: STREPTOtest16 для идентификации стрептококков и EN-COCCUStest для идентификации энтерококков.

Для идентификации грамотрицательных ферментирующих бактерий наряду с ENTEROtest 16 в настоящее время предложены модифицированная тест-система ENTEROtest 24 и 2 новые тест-системы для ускоренной идентификации энтеробактерий (4 часа) ENTERO-Rapid 24 и, в основном для уропатогенных культур, ENTERO-Screen.

Для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий новая тест-система NEFERMtest 24.

Анаэробные микроорганизмы идентифицируют с помощью ANAEROtest 23.

Студенты получают планшеты для идентификации микроорганизмов, результаты идентификации заносят в таблицу.

Таблица

STAPHYtest16 биохимическая активность, вид	STREPTOtest16 биохимическая активность, вид	ENTEROtest 16 биохимическая активность, вид	NEFERMtest 24 биохимическая активность, вид	ANAEROtest 23 биохимическая активность, вид

Контрольные вопросы: 1. Какое таксономическое значение имеет определение набора ферментов у микроорганизмов? 2. Как определяются сахаролитические свойства с помощью сред Гисса? 3. Способ определения индола? 4. Способ определения сероводорода? 5. Способ определения протеолитической активности микроорганизмов. 6. Способ определения каталазной активности микроорганизмов

2.5 Лабораторное занятие №5 (2 часа)

Тема: «Возбудитель колибактериоза»

2.5.1 Цель работы: 1. Изучить лабораторную диагностику стафилококкозов, колибактериоза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей колибактериоза. 3. Изучить биопрепараты.

2.5.2 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, диффрэд, термостат, пробирки и чашки Петри с культурами *E. coli*, стекла с лунками, набор сывороток для серотипизации, биопрепараты

2.5.3 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 – пиемия и септицемия. пищевые токсикозы (токсикоинфекции). Род *Staphylococcus* входит в семейство *Micrococcaceae*. Данный род включает три вида: *St. aureus*, *St. epidermatus*, *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. wameryi*, *St. cupitis*, *St. scirri*, *St. simulans*, *St. hominis*, *St. hyicus*, *St. intermedius*.

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*), выделяет 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 котяткам. При наличии энтеротоксина через 1-2 ч у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвота.

Биопроба для определения свойств: летальных – на кроликах; дерматонекротических – на кроликах; токсических – на котятках.

Серологическая диагностика в ветеринарии не используется.

Работа 1.

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?

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-антигена, 55 вариантов Н-антигена и 90 вариантов К-антигена.

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 грамтрицательная 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 высев 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°С в течение 18-20 ч, смывают физиологическим раство-

ром, переносят в сухие стерильные пробирки, прогревают в водяной бане при 100 °С 1 ч для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов или автоклавируют при 120°С 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*10³/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 0,5мл 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 1·10⁹/мл по бактериальному стандарту мутности и вводят по 0,5 мл внутрибрюшинно трем белым мышам массой 14-16 г и трем цыплятам трех-четырёхнедельного возраста (при исследовании материала от птиц). В случае гибели двух зараженных мышей и более или цыплят выделенную культуру считают патогенной.

Биопрепараты. Вакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсальная 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 2.

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*?

2.6 Лабораторное занятие №6 (2 часа)

Тема: «Возбудитель рожи свиней»

2.6.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики рожи свиней и туберкулёза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей рожи свиней и туберкулёза. 3. Изучить биопрепараты.

2.6.2 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, дифряд, сыворотка для серотипизации, набор красок для окрашивания по Циллю-Нильсену, пробирки с культурами вакцинного штамма микобактерий, готовые микропрепараты микобактерий, биопрепараты.

2.6.3 Описание (ход) работы:

Возбудитель рожи свиней - бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вызывает инфекционную болезнь, характеризующуюся при остром течении септициемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом - эндокардитом и артритом. 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 септициемией и воспалительной эритемой кожи, при подостром – «крапивницей», при хроническом – эндокардитом и артритом.

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-Иваньи (МПА с 0,1% кристаллвиолета и 1% азида натрия). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; 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 жидкая живые вакцины против рожи свиней из штамма ВР-2, лечебно профилактическая противорожистая сыворотка.

Работа 1.

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?

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, гидролиз 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 туберкулез-

ные 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-пурифицированный-дериват - ППД). В ветеринарии используют стандартизированный 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 2.

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 туберкулеза?

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

3.1 Практическое занятие №1 (2 часа)

Тема: «Серологические реакции. Оборудование для постановки серологических реакций»

3.1.1 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.

3.1.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы, антигены, сыворотки, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками

3.1.3 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 37⁰⁰ 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?