

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Дальневосточный государственный
аграрный университет

О. Л. Якубик, З. А. Литвинова

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие к
лабораторным работам для обучающихся по направлению
подготовки
36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Благовещенск
Дальневосточный ГАУ
2021

УДК 579.62(075.8)

ББК 48я73

Я49

Рецензенты:

А. М. Кузьменко, кандидат ветеринарных наук, заместитель
начальника ГБУ АО «Благовещенская ГСББЖ»

А. В. Корнилова, кандидат биологических наук, доцент кафедр
патологии, морфологии и физиологии

Одобрено и рекомендовано к изданию методическим советом
факультета ветеринарной медицины и зоотехнии Дальневосто-
чного ГАУ

Якубик, Ольга Леонидовна Микробиология учебно-
методическое пособие к лабораторным работам /
Я49 О. Л. Якубик, З. А. Литвинова ; Дальневосточный госу-
дарственный аграрный университет, Факультет ветери-
нарной медицины и зоотехнии. – Благовещенск: Дальне-
восточный ГАУ, 2021. – 222 с.

В учебно-методическом пособии приведены материалы о струк-
туре и оборудовании ветеринарно-микробиологической лабора-
тории, о методах микроскопии, культивировании и выделении
чистых культур, идентификации микроорганизмов, серологиче-
ской диагностики, определении антибиотикорезистентности
бактерий и активности фагов; о методах диагностики инфекци-
онных болезней бактериальной этиологии. Пособие предназна-
чено для проведения лабораторных работ по дисциплине «Мик-
робиология» для обучающихся по направлению подготовки
36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

УДК 579.62(075.8)

ББК 48я73

© Якубик, О. Л., Литвинова, З. А., 2021

© Дальневосточный государственный
аграрный университет, 2021

Оглавление

Введение	6
Лабораторная работа 1	
Бактериологическая лаборатория. Техника безопасности в лаборатории. Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в микробиологической практике	8
Лабораторная работа 2	
Бактериологические краски. Приготовление биопрепаратов. Простые методы окрашивания	15
Лабораторная работа 3	
Сложные методы окраски: по граму, циль-нильсену	19
Лабораторная работа 4	
Окраска спорообразующих и капсулообразующих микроорганизмов	22
Лабораторная работа 5	
Окраска извитых форм бактерий	29
Лабораторная работа 6	
Морфология микроскопических грибов	31
Лабораторная работа 7	
Подвижность микроорганизмов, включения	42
Лабораторная работа 8	
Лабораторная аппаратура. Методы стерилизации	
Приготовление питательных сред	47
Лабораторная работа 9	
Техника посева микроорганизмов. Методы получения чистой культуры	64
Лабораторная работа 10	
Изучение культуральных и ферментативных свойств микробов	71
Лабораторная работа 11	
Антибиотики и бактериофаги. Методы определения определения антибиотикорезистентности бактерий активности фага	79

Лабораторная работа 12	
Правила заражения и вскрытия лабораторных животных	87
Лабораторная работа 13	
Санитарно-микробиологическое исследование воды, почвы, воздуха.....	93
Лабораторная работа 14	
Микрофлора молока и молочных продуктов	103
Лабораторная работа 15	
Микрофлора кормов, мяса, яиц	112
Лабораторная работа 16	
Серологическая диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Реакция преципитации	124
Лабораторная работа 17	
Реакция агглютинации: пробирочный метод, капельный и другие модификации. Постановка реакции связывания комплимента	130
Лабораторная работа 18	
Индикация патогенных стафилококков и стрептококков	147
Лабораторная работа 19	
Индикация возбудителя колибактериоза (эшерихиоза)..	155
Лабораторная работа 20	
Индикация возбудителя сальмонеллеза.....	160
Лабораторная работа 21	
Индикация рожи свиней и листериоза.....	168
Лабораторная работа 22	
Индикация возбудителя туберкулеза	175
Лабораторная работа 23	
Индикация возбудителя бруцеллеза	181
Лабораторная работа 24	
Индикация возбудителя сибирской язвы.....	188
Лабораторная работа 25	
Индикация возбудителей столбняка и ботулизма	194

Лабораторная работа 26	
Индикация возбудителей эмфизематозного карбункула и злокачественного отека	199
Лабораторная работа 27	
Возбудители микроспории, трихофитии, парши	210
Список литературы	219

Введение

Целью освоения дисциплины «Микробиология» является формирование у студентов научного мировоззрения о многообразии биологических объектов, микробиологических приемов и методов диагностики инфекционных болезней животных, роли микроорганизмов в общебиологических процессах, в патологии животных и порчи пищевых продуктов.

Задачи освоения дисциплины: приобретение студентами знаний в области систематики и номенклатуры микробов, их строения и функций, генетических особенностей, их роли в экологии; формирование умения использовать современные методы изучения биологических свойств микроорганизмов и их идентификации; изучение возбудителей инфекционных болезней животных; приобретение навыков лабораторной диагностики инфекционных болезней животных; изучение основ санитарной микробиологии.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

- способен определять биологический статус, нормативные общеклинические показатели органов и систем организма животных, а также качества сырья и продуктов животного и растительного происхождения (ОПК-1);

- способен идентифицировать опасность риска возникновения и распространения заболеваний различной этиологии (ОПК-6).

В результате освоения дисциплины «Микробиологии» обучающийся должен демонстрировать следующие результаты образования:

- определять качество сырья и продуктов животного и растительного происхождения;

- учитывать условия возникновения и распространения заболеваний различной этиологии;
- идентифицировать опасность риска возникновения и распространения заболеваний различной этиологии;
- обеспечивать выбор и реализацию мер, которые могут быть использованы для снижения риска возникновения и распространения заболеваний различной этиологии.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ.
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ.
УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА.
ОСОБЕННОСТИ МИКРОСКОПИИ В
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Цель занятия: ознакомить студентов с устройством бактериологической лаборатории кафедры, ее оборудованием и с правилами техники безопасности; представить общую схему проведения бактериологической диагностики; дать возможность изучить устройство светового микроскопа и освоить методику микроскопии готовых окрашенных препаратов с применением иммерсионной системы; ознакомиться с основными формами бактерий.

Оборудование микробиологической лаборатории

1. Микроскопы - оптические, люминесцентные, осветительные приборы.
2. Термостаты, в которых автоматически поддерживается температура, оптимальная для выращивания микроорганизмов в диапазоне от 28 до 43°C.
3. Электрический сушильный шкаф и автоклав, предназначенные для стерилизации лабораторной посуды, питательных сред и спецодежды.
4. Холодильники и морозильные камеры, используемые для хранения питательных сред, музейных бактериальных культур, биопрепаратов, а также исследуемого материала.
5. Центрифуги, предназначенные для осаждения микроорганизмов, эритроцитов, для отделения прозрачного экстракта из исследуемого продукта.
6. Дистиллятор, необходимый для получения дистиллированной воды, на которой готовят физиологический

раствор, питательные среды, рабочие растворы красок; автоматические водяные бани, аналитические и торзионные весы, колба Бунзена с вмонтированным фильтром Зейтца, керамические фильтры Шамберляна, Беркефельда и вакуумный насос.

7. Лабораторная посуда: колбы, бактериологические, серологические и уленгутовские пробирки, чашки Петри, автоматические пипетки, стеклянные градуированные и пастеровские пипетки, мерные цилиндры.

8. Мелкие металлические инструменты: бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы.

Техника безопасности в микробиологической лаборатории

1. Заходить в лабораторию и работать там можно только в спецодежде.

2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи и продукты питания.

3. За каждым студентом закрепляется рабочее место и микроскоп.

4. Без разрешения преподавателя нельзя включать электроприборы.

5. Студент должен поставить в известность преподавателя при загрязнении предметов окружающей среды инфицированным материалом для проведения немедленной дезинфекции.

6. После окончания работы весь исследуемый материал, а также использованные бактериальные культуры, инструменты необходимо поместить в контейнеры и отдать преподавателю для стерилизации в автоклаве.

7. Уходя из лаборатории, необходимо снять спецодежду, тщательно вымыть руки, в случае надобности обработать их дезинфицированным раствором.

8. Каждый студент должен расписаться в специальном журнале о знании правил техники безопасности при работе с микроорганизмами.

Принципы организации и оборудование бактериологических лабораторий

В бактериологических лабораториях проводят исследование патологического материала с целью диагностики инфекционных болезней на туберкулез, бруцеллез, сибирскую язву, рожу свиней и др. В каждой лаборатории должны быть предусмотрены:

1) боксы для работы с отдельными группами бактерий или вирусов;

2) помещения для серологических исследований, приготовления питательных сред, стерилизации и мойки посуды; виварий с отдельными боксами для здоровых и подопытных животных.

В бактериологической лаборатории должно быть оборудовано место для окраски микроскопических препаратов с набором анилиновых красителей, реактивов, спиртовок, сливных чаш, фильтровальной бумаги, банок с дезинфицирующим раствором и т. д.

Устройство микроскопа. Особенности микроскопии в микробиологической практике

Оптические микроскопы позволяют исследовать микроорганизмы в проходящем свете. Такие микроскопы состоят из механической и оптической частей (рис.1).

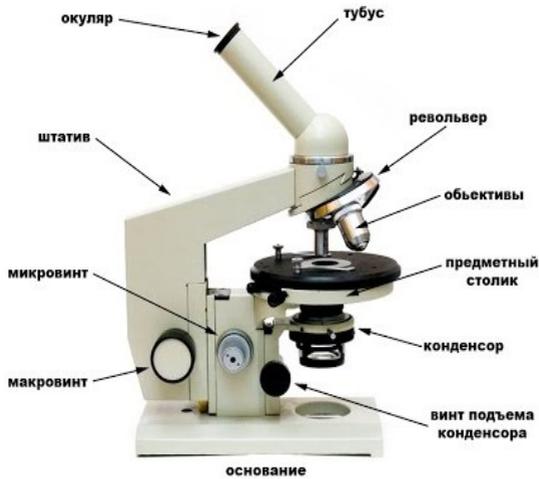


Рисунок 1 – Устройство микроскопа

Механическая часть включает штатив с предметным столиком и тубус. Предметный столик с помощью винтов может перемещаться в горизонтальной плоскости. Он имеет две клеммы, прижимающие предметное стекло к столику. Тубусодержатель может перемещаться с помощью макро- и микровинта, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки изучаемого объекта. Микровинт относится к наиболее уязвимым деталям микроскопа, поэтому с ним нужно обращаться особенно осторожно. Полный оборот микровинта поднимает или опускает тубус на 0,1 мм.

В верхней части тубусодержателя находится револьверное устройство, вращающееся вокруг своей оси, в отверстия которого ввинчены объективы. В верхний конец тубуса вставляется окуляр.

Оптическая часть состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата. Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе, между ко-

торами помещена диафрагма. На окуляре имеются цифровые обозначения (x7, x10, x15), показывающие степень увеличения изображения. Объективы представляют собой систему оптических линз. Только одна линза - фронтальная - выполняет функцию увеличения, остальные - корректирующие. На объективах имеются обозначения, показывающие увеличение, даваемое объективом):

1) x8 - объектив применяют для наведения света и поиска объекта;

2) x40 - объектив применяют для изучения строения микроскопических грибов, дрожжей и подвижности бактерий в препарате «висячая капля»;

3) x 90 - иммерсионный объектив применяют для изучения бактерий с применением иммерсионного масла.

Объективы, дающие увеличение в x8 и x40 раз, называются сухими, так как при работе с ними между объективом и препаратом находится слой воздуха, коэффициент преломления которого равен 1,0, а коэффициент преломления стекла равен 1,52. Данная разница приводит к тому, что часть боковых лучей преломляется и отклоняется, не попадая в объектив, но освещение при этом не ухудшается, так как диаметр линз x8 и x40 кратных объективов достаточно велик.

Иммерсионным называется объектив, при работе с которым между препаратом и объективом помещают каплю иммерсионного масла. Иммерсионное масло имеет оптический коэффициент преломления (1,51), близкий к коэффициенту преломления стекла, благодаря этому световые лучи, проходя через однородную среду, не отклоняются от своего направления, попадают на линзу объектива и создают хорошее освещение. В рассматриваемом микроскопе 90-кратный объектив является иммерсионным, и он применяется при изучении бактерий.

Общее увеличение, которое дает микроскоп, равняется произведению степени увеличения объектива на показатель окуляра. В учебном процессе удобнее применять 10-кратный окуляр, дающий оптимальный обзор поля зрения. Следовательно, при изучении под 90-кратным иммерсионным объективом и 10-кратным окуляром микроорганизмы будут увеличены в 900 раз. Четкость получаемого изображения зависит от разрешающей способности микроскопа, то есть способности разделять две близко расположенные точки, расстояние между которыми равно половине длины световой волны. Рассматриваемый нами микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2–0,3 мкм. Из этого следует, что микроорганизмы величиной менее 0,2 мкм в данном микроскопе не видны.

Осветительный аппарат состоит из конденсора, зеркала и ирисовой диафрагмы. Он предназначен для наилучшего освещения объекта. С помощью зеркала лучи света, исходящие от источника света, направляются в конденсор, концентрирующий лучи в своем фокусе. Поверхность зеркала с одной стороны плоская, с другой - вогнутая. При естественном освещении лучше применять вогнутую поверхность, при искусственном освещении (например, с осветителем) - плоскую.

Конденсор с ирисовой диафрагмой представляет собой систему оптических линз и служит для концентрации отраженных зеркалом лучей света. При опускании конденсора при помощи винта вниз поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии - освещается. Ирисовая диафрагма помещается под конденсором и служит для регулирования потока света, которое осуществляется с помощью рычажка: расширяет или сужает диаметр отверстия, пропускающего свет к конденсору. Выпускаются также дополнительные приспособления, которые позволяют максимально использовать все возможности микроскопа и

значительно расширяют диапазон применения: фазово-контрастные приспособления, осветители, окуляр-микрометр и объектив-микрометр для измерения размеров микроорганизмов.

Правила работы со световым микроскопом

1. Установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа. Для этого необходимо: поставить объектив х8 на высоте 1 см от уровня предметного столика; поднять конденсор до уровня предметного столика; направить плоское зеркало в сторону осветителя.

2. Установить препарат на предметном столике, закрепив клеммами.

3. Нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата.

4. Заменить объектив х8 на х90.

5. Под контролем глаза осторожно опустить объектив х90 в масло.

6. Наблюдая в окуляр, медленно поднимать объектив микровинтом до появления какого-либо изображения.

7. Установить четкое изображение с помощью микровинта, вращая его наполоборота в ту или иную сторону.

После окончания работы необходимо привести микроскоп в порядок:

1. Поднять макровинтом тубус микроскопа.

2. Убрать препарат.

3. Снять салфеткой масло с х90 объектива и установить х8 объектив.

4. Опустить конденсор.

5. Положить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

Контрольные вопросы

1. Расскажите основные правила работы в бактериологической лаборатории.
2. Какое оборудование используют в микробиологической лабораторной практике?
3. Расскажите устройство микроскопа. Из каких частей он состоит?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСКИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ. ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

Цель занятия: ознакомиться с основными анилиновыми красками, применяемыми в бактериологических лабораториях; овладеть методикой приготовления мазка на предметном стекле и окрашивания его простым методом; научиться дифференцировать основные формы бактерий при микроскопии.

Исследуемым материалом в бактериологии являются:

- а) для прижизненной диагностики - кровь, гной, выделения;
- б) для посмертной диагностики - кусочки паренхиматозных органов;
- в) в санитарной микробиологии - продукты животного происхождения: мясо, молоко, яйца, рыба и т. д.

Все работы ведутся в условиях бокса над пламенем спиртовки, чтобы исключить загрязнение исследуемого материала и окружающей среды. Материал берут в объеме бактериологической петли и наносят на предметное стекло, которое должно быть чистым и обезжиренным. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, расте-

кается равномерно, на плохо обезжиренном - собирается в капельки.

Бактериологические краски

Оптическая плотность неокрашенных бактерий значительно отличается от оптической плотности стекла. Поэтому при изучении морфологии бактерий под микроскопом для повышения контрастности их окрашивают анилиновыми красками.

Различают основные и кислые краски. У основных красителей ионом, придающим бактериальной клетке окраску, служит катион, у кислых - анион. Клеточные структуры бактерий, взаимодействующие с красителем, заряжены преимущественно отрицательно и поэтому лучше воспринимают основные красители, к которым относятся: генцианвиолет; кристаллический фиолетовый; красные - основной фуксин, сафранин; метиленовая синь; маляхитовый зеленый Анилиновые краски, применяемые в микробиологии, имеют порошкообразный или кристаллический вид. Они плохо растворяются в воде, поэтому вначале готовят насыщенные спиртовые растворы красок (1:10), из которых затем получают рабочие водные растворы. Для повышения проницаемости красок в клеточную стенку бактерий в некоторые растворы добавляют щелочь, карболовую кислоту (фенол).

В бактериологической практике чаще применяют следующие краски:

1) щелочная метиленовая синь (синька Леффлера); применяется для простого метода окрашивания, она всегда должна находиться на столе у бактериолога;

2) карболовый основной фуксин Циля - концентрированная краска, хранится долгое время; применяется при окрашивании трудно прокрашивающихся бактерий, таких

как возбудитель туберкулеза, споры бактерий (краска красного цвета);

3) разведенный фуксин (фуксин Пфейффера) - фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:10; применяется для простого метода окрашивания или как один из компонентов окраски по Граму, краску готовят перед применением и используют в течение одного рабочего дня;

4) карболовый генцианвиолет используют как основной краситель при окраске по Граму, в модификации по Синеву чаще применяют в виде кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных краской и высушенных;

5) раствор малахитовой зелени (однопроцентный водный), применяемый при окраске бруцелл по Козловскому.

Методика приготовления препарата для микроскопии

1. Приготовление мазка. Для этого на предметном стекле с обратной стороны карандашом по стеклу обводят круг диаметром 2–3 см. Жидкий исследуемый материал берут петлей и распределяют в области круга, а микробную культуру с поверхности плотной питательной среды снимают бактериальной петлей и растирают на предметном стекле в капле заранее нанесенной воды. Из кусочков паренхиматозных органов делают мазки-отпечатки. Для этого местом свежего среза прикасаются к предметному стеклу, делая несколько отпечатков. Обязательное условие – мазок должен быть очень тонким.

2. Высушивание мазка проводится на воздухе, для ускорения процесса можно сушить в теплом потоке высоко над спиртовкой.

3. Фиксация мазка преследует две цели: прикрепить бактерии к предметному стеклу и убить их, так как убитые

микробы лучше окрашиваются (а заодно обезопасить бактериолога, так как среди исследуемых бактерий могут быть и патогенные). Фиксацию мазков проводят одним из двух способов. Физический метод фиксации заключается в медленном трехкратном проведении предметного стекла с мазком через наиболее горячую часть пламени в общей сложности 2–3 секунды, в зависимости от толщины стекла (держат мазком вверх). Если при прикосновении стекла к руке ощущается легкий ожог, значит, цель достигнута - микробы убиты. Не следует перегревать мазок, иначе произойдет деформация формы клеток. При химическом методе фиксации препарат погружают на 5 минут в метиловый спирт или на 10–15 минут в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира). Этот метод фиксации щадящий и его рекомендуют применять для препаратов, приготовленных из крови или паренхиматозных органов, а также из сметаны и сливочного масла, так как эфир обезжиривает препарат.

4. Окраска мазка, которая производится простым или сложным методом.

Простой метод окрашивания

При данном методе применяется одна краска. Он позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, а также изучить их морфологию (форму, взаиморасположение). В качестве исследуемого материала на лабораторном занятии можно использовать взвесь непатогенной культуры кишечной палочки, сенной палочки, находящейся в пробирке с МПБ, или свой зубной налет, взятый спичкой и распределенный на предметном стекле. В микрофлоре зубного налета здорового человека представлены все морфологические группы бактерий, поэтому она является полиморфной: микрококки, стрепто-

кокки, стафилококки, извитые и нитевидные формы, молочнокислые палочки, дрожжи и т. д.

Контрольные вопросы

1. Какие красители используют для окраски бактерий?
2. Опишите методику приготовления мазков, мазков-отпечатков для микроскопии.
3. В чем заключается простой метод окраски?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3 СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ: ПО ГРАМУ, ЦИЛЬ-НИЛЬСЕНУ

Цель занятия: освоить методику окраски по Граму; свободно овладеть методикой приготовления и окрашивания препарата для микроскопии.

Различные виды бактерий имеют разный химический состав и отличаются по строению клеточной стенки, поэтому неодинаково воспринимают окрашивание анилиновыми красками. Избирательное отношение микроорганизмов к различным красителям называют *тинкториальными свойствами*. По тинкториальным свойствам все бактерии разделены на две группы: грамположительные и грамотрицательные.

Методика окрашивания по Граму

1. На фиксированный мазок накладывают сухой кусочек фильтровальной бумаги (11 см), заранее пропитанный раствором генцианвиолета (модификация А. В. Синева), и наносят 3 капли воды на 2 минуты. В результате все бактерии окрашиваются одинаково в фиолетовый цвет. Затем фильтровальную бумагу с генцианвиолетом удаляют.

2. Наносят несколько капель раствора Люголя на 2 минуты. Затем раствор стряхивают (значение этого этапа заключается в том, что только с компонентами грамположительных бактерий ионы йода вступают в прочную связь).

3. В центр мазка наносят 96-процентный этиловый спирт, который через 40–50 секунд смывают. В течение этого периода предметное стекло лучше держать в руках строго горизонтально. Так как спирт растекается, его наносят несколько раз. В результате грамотрицательные бактерии обесцвечиваются.

4. Бактерии дополнительно окрашивают разведенным фуксином. В красный цвет окрашиваются обесцвеченные бактерии уже через 3 минуты, затем краску смывают водой.

5. Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсионным объективом.

Микрокартина: грамположительные бактерии окрашены в фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в розовый цвет.

Суть окрашивания по Граму заключается в том, что компоненты грамположительных бактерий с генцианвиолетом в присутствии ионов йода образуют прочный комплекс, который при действии спиртом не вымывается через узкие поры в толстом слое пептидогликана. Поэтому бактерии остаются фиолетовыми. Грамотрицательные бактерии имеют другой химический состав и строение клеточной стенки, поэтому при воздействии этиловым спиртом генцианвиолет вымывается через широкие поры в клеточной стенке. Бактерии обесцвечиваются и, принимая цвет дополнительного красителя, становятся красными. Отношение бактерий к окраске по Граму изучают для определения вида.

Примечание: шаровидные бактерии почти всегда грамположительные; бациллы и клостридии в молодой культуре всегда грамположительные; бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и извитые формы - грамотрицательные.

Окраска бактерий по методу Циля-Нильсена

Кислотоустойчивые бактерии – грамположительные. Однако повышенное содержание в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты придает клетке гидрофобные свойства, затрудняющие проникновение в нее красителя и усиливающие ее устойчивость к воздействию растворов кислот.

Исходя из этих особенностей был разработан метод, с помощью которого выявляют кислотоустойчивые виды.

Фиксированный мазок окрашивают через фильтровальную бумажку (1см²) карболовым фуксином Циля с подогреванием до появления паром. Оставляют на «мостики» до остывания, повторяют нагрев. Общая экспозиция 3-7 минут. Бумажку удаляют, краску сливают, на препарат, не промывая водой, наносят 3-5-процентный раствор серной кислоты на 5-7 секунд. Затем препарат промывают водой и окрашивают раствором метиленовой сини Леффлера 4-5 минут, после чего промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: кислота не обесцветила кислотоустойчивые бактерии, они окрашены в красный цвет; не кислотоустойчивые бактерии восприняли дополнительный синий краситель.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип сложного метода окраски?
2. В чем сущность окраски мазков методом Грама?

3. Опишите методику окраски мазков методом Циль-Нильсена?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4 ОКРАСКА СПОРООБРАЗУЮЩИХ И КАПСУЛООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: Ознакомить обучающихся с методами обнаружения у бактерий спор, капсул.

Выявление бактериальных спор

Спора – особая форма существования грамположительных бактерий, формируется эндогенно. Она характеризуется специфическими структурами (многослойные белковые покровы, наружная и внутренняя мембраны, кортекс) и повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды.

Неблагоприятными условиями для бактерии являются:

1. Недостаток влаги и питательных веществ.
2. Избыток продуктов метаболизма.
3. Старение бактериальной культуры.

Чаще споры образуют почвенные микроорганизмы, поэтому почва является резервуаром спорообразующих бактерий и источником загрязнения продуктов животного происхождения (*Bac.antracis*, *Bac.subtilis*, *Cl.perfringens*). У бактерий в стадии споры прекращаются все физиологические процессы, и она переходит в анабиоз. При изменении условий – появление пищи и влаги – активизируются ферменты, и споры прорастают в вегетативную форму, для которой характерны все физиологические проявления жизни: питание, дыхание и размножение.

Одна бактерия образует только одну спору, то есть это не размножение, а сохранение вида в неблагоприятных условиях.

Все бактерии, образующие споры, называются бациллами. Палочки, у которых диаметр спор превышает ширину вегетативной клетки, принято называть клостридиями.

Споры с большим трудом воспринимают красители, но прочно удерживают их после окраски. На этой особенности спор основаны все методы их выявления. Для окрашивания спор применяют красители с протравителями (карболовый фуксин и др.) и подогревание, чтобы увеличить проницаемость оболочки. Для разрыхления оболочки иногда перед окраской препараты обрабатывают хромовой или другими неорганическими кислотами.

Метод Златогорова

Готовят мазок из 2-3 дневной бульонной культуры спорообразующих бактерий. На фиксированный мазок наносится карболовый фуксин и красится при подогревании над пламенем спиртовки в течение 7-10 минут до появления пара. В красный цвет окрашиваются споры и вегетативные клетки. Препарат обесцвечивают 2-процентным раствором серной кислоты в течение 1-3 секунд (за это время обесцвечивается вегетативная клетка). Далее препарат обильно промывают водой, чтобы прекратить действие кислоты. Обесцвеченные вегетативные клетки дополнительно окрашивают метиленовой синью в течение 4-5 минут.

Микрокартина: споры – красные, вегетативная клетка – синяя.

Метод Мёллера

Фиксированный мазок обрабатывают 5-процентным раствором хромовой кислоты при легком подогревании в течение 10 минут, промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой. Затем на фильтровальную бумагу (1 см²) помещенную на мазок, наносят карболовый фуксин и подогревают до появления паров, дают остыть, повторяют нагревание 2-3 раза. Общая экспозиция окрашивания карболовым фуксином 7 минут (мазок должен быть влажным). Бумагу с краской сбрасывают бактериальной петлей, не промывая водой. Мазок обрабатывают 5-процентным раствором серной кислоты в течение 5-7 секунд, после чего тщательно промывают водой и докрашивают метиленовым синим 3 минуты. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: споры окрашены в розово-красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Метод Вальдмана

На фиксированный мазок наносят щелочную синьку Леффлера и нагревают до кипения, дают остыть и промывают водой. Докрашивают 1-процентным водным раствором нейтральрота в течение 30 секунд, промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: споры синие, вегетативные клетки красные.

Метод Пешкова

Фиксированный мазок окрашивают метиленовым синим с подогреванием до закипания, затем промывают водой и докрашивают однопроцентным водным раствором нейтральрота в течение 10 секунд. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: споры – синие, вегетативные клетки – красные.

Метод Ауески

Нефиксированный мазок обрабатывают 0,5-процентным раствором соляной кислоты 2-3 минуты при подогревании, затем промывают водой и фиксируют над пламенем горелки. Окрашивают карболовым фуксином Циля при подогревании 7-8 минут. Краску сливают и препарат обрабатывают 5-процентным раствором серной кислоты 5-7 минут, промывают водой и докрашивают метиленовым синим 4-5 минут, после чего вновь промывают водой и подсушивают.

Микрокартина: споры – красные, вегетативные клетки – синие.

Метод Шеффера – Фултона

Фиксированный мазок покрывают фильтровальной бумагой, наливают 0,5-процентный водный раствор малахитовой зелени и выдерживают 5 минут над кипящей водой. После чего промывают водой и окрашивают 2-процентным водным раствором сафранина 30 с. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: споры – зеленые, вегетативные клетки – красно-коричневые.

Выявление капсул бактерий

Капсула – это слизистое образование, обволакивающее клетку и сохраняющее связь с клеточной стенкой. У большинства прокариот капсула построена из полисахаридов гомо- или гетерополимерной природы. У некоторых видов бактерий капсула содержит полипептид – полимер D-глутаминовой кислоты. Вещество капсулы обычно воспринимает краситель слабее, чем другие клеточные ком-

поненты, поэтому при специальных методах окраски можно дифференцировать капсулу от остальных структур. Многие виды патогенных бактерий образуют капсулу, которая выполняет защитную функцию в основном за счет снижения эффективности фагоцитоза.

Метод Михина

Препарат окрашивают щелочной синькой Леффлера с подогреванием до появления паров и затем выдерживают еще 5-6 минут (мазок должен быть влажным). Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой. Обычно используют старые растворы красителя, так как у них больше выражена способность к метахроматической окраске.

Микрокартина: капсула – розовая, клетки – синие.

Метод Ольта

Фиксированный мазок окрашивают при подогревании 2-процентным водным раствором сафранина, приготовленным *ex tempore* (сейчас). Экспозиция окрашивания 1-2 минуты. Затем промывают водой, подсушивают. На мазок наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом.

Микрокартина: капсула – бледно-желтая, клетка – красно-коричневая

Метод Антони

Нефиксированный мазок обрабатывают 1-процентным водным раствором кристаллвиолета 2 минуты, после чего промывают 20-процентным водным раствором сульфата меди и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микрокартина: капсулы – сине-фиолетовые, клетки – темно-синие.

Метод Романовского – Гимза

Препарат, фиксированный в этаноле или жидкости Никифорова, кладут мазком вниз в чашку Петри с подставками (деревянные или стеклянные палочки). Под препарат наливают краску Романовского-Гимзы (15-20 капель краски на 10 миллилитров дистиллированной воды). Выдерживают 15-20 минут. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: капсула – розовая, клетка – темно-синяя.

Метод Ребигера

Нефиксированный мазок окрашивают 15-20 секунд раствором генцианвиолета в формалине. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: капсула – красно-фиолетовая, клетка – темно-фиолетовая.

В мазках-отпечатках из тканей больного животного капсулированные клетки легко обнаружить благодаря контрастирующему фону, который образован плазмой и тканевыми элементами. Для имитации подобного фона при выявлении капсул у клеток бактериальных культур разработаны специальные методы окраски.

Методы Гиса

На предметное стекло наносят каплю нормальной сыворотки крови животного любого вида, петлей вносят в нее и суспендируют изучаемую культуру. Суспензию распределяют равномерным тонким слоем по поверхности стекла. Препарат фиксируют на пламени и окрашивают 0,1-процентным водным раствором кристаллвиолета в течение 1 минуты. Мазок промывают 20-процентным водным раствором сульфата меди, подсушивают фильтровальной бумагой.

Микрокартина: капсула – бледно-голубая, клетка – темно-фиолетовая, фон – фиолетовый.

Метод Ганса

На край предметного стекла помещают каплю черной туши, предварительно разведенной дистиллированной водой в соотношении 1:3 и центрифугированной при 3000 оборотов в минуту. Вторым предметным стеклом суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла, то есть мазок готовят так же, как мазки из капли крови. Мазок высушивают, фиксируют на пламени и окрашивают карболовым фуксином Циля, разведенным дистиллированной водой в соотношении 1:3. Экспозиция окрашивания 4-5 минуты. Препарат промывают водой и подсушивают.

Микрокартина: капсула видна как светлый или розовый ободок вокруг темно-красных клеток бактерий, общий фон за счет туши черный.

Контрольные вопросы

1. Что такое спора и для чего она нужна?
2. С какой целью бактерии образуют капсулу?
3. Перечислите методы выявления спор и капсул.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5 ОКРАСКА ИЗВИТЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ

Цель занятия: Изучить основные способы окраски извитых форм бактерий.

Извитые бактерии обладают спиральной симметрией. К ним относятся вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы (от лат. *vibrio* - извиваюсь) имеют цилиндрическую изогнутую форму, образуя 1/4–1/2 завитка спирали, и по форме напоминают запятую; сапрофиты и патогенные. Например, *Vibrio cholerae*.

Спириллы (от лат. *spira* - изгиб) имеют форму спирально извитых палочек с 4–6 витками. Обитают в пресной и морской воде. Преимущественно сапрофиты (*Spirillum volutans*); патогенные виды *S. minus* и кампилобактеры (*Campylobacter fetus*).

Спирохеты (*spirochaeta* - извитые бактерии; от греч. *speira* - изгиб и *chaite* - длинные волосы) прокариоты спирально извитой формы. У них существует два типа витков: первичные - образованные изгибами протоплазматического цилиндра, и вторичные - представляющие изгибы всего тела. Спирохеты - эластичные спиралевидные длинные клетки, состоящие из осевой нити (аксистиля), цитоплазмы с рибосомами и включениями нуклеоида, мезосом, цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Движение спирохет происходит за счет активного сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра. Формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное.

Кристиспириты - гигантские прокариоты (28–150 мкм), спирально изогнутые, с плоской зернистой килевидной мембраной (крита) вдоль тела клетки.

Трепонемы - спиралевидные эластичные бактерии размером от 0,1–0,5 до 5–20 мкм; осевая нить состоит из

одной или четырех фибрилл; четко выражены равномерные или неравномерные завитки; подвижны. Типовой вид - *Treponema pallidum*.

Боррелии - извитые нитевидные бактерии размером от 0,2 – 0,5 до 5–30 мкм; осевая нить состоит из 15–20 параллельных фибрилл.

Лептоспиры - спиралевидные бактерии диаметром 0,1 – 0,25 и длиной 6–30 мкм, формирующие около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков и 1–2 вторичных, придающих клетке форму букв G, S, C. Например, *Leptospira interrogans*.

Морфологию спирохет изучают при помощи светового микроскопа в окрашенных препаратах, а в живом состоянии — в фазово-контрастном или темнопольном микроскопе. Спирохеты различают по способности окрашиваться. Так, боррелии хорошо окрашиваются обычными анилиновыми красителями, а трепонемы, лептоспиры требуют специальных методов окраски. Наиболее широко распространен метод окраски по Романовскому - Гимза.



Рисунок 2 – Окраска извитых форм бактерии методом Бурри

Контрольные вопросы

1. Какие виды извитых форм бактерий существуют?
2. Опишите методику окраски спирохет Романовско-го-Гимза

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6 МОРФОЛОГИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Цель занятия: Ознакомить студентов с особенностями морфологии и методами исследования микроскопических грибов различных таксономических групп.

Грибы – это хемоорганотрофные микроорганизмы с эукариотической клеточной организацией. Они лишены фотосинтетических пигментов и широко распространены в природе. Грибы относятся к царству Fungi или Mucota, включающего в себя около 120 тысяч видов. Для ветеринарной практики наибольшее значение имеют микроскопические грибы, вызывающие патологию у животных и людей, - представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Candida*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Stachybotrys*, *Dendrodochium*.

Морфология грибов. У большинства видов вегетативное тело (таллом) состоит из ветвящихся нитевидных клеток (гифов), образующих мицелий, или грибницу. Нитевидные грибы (гифомицеты) условно называют плесневыми. Существуют и одноклеточные неветвящиеся грибы – дрожжи, дрожжеподобные (рис.2).

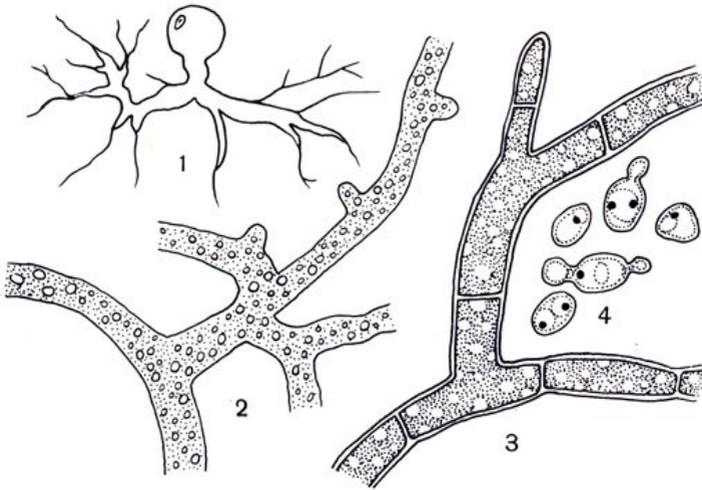


Рисунок 2 – Вегетативное тело грибов: 1 – Грибница; 2- Несептированный мицелий; 3 – Септированный мицелий; 4 - Почкующиеся клетки дрожжей

Различают мицелий субстратный, контактирующий с питательной средой, и воздушный, возвышающийся над нею. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра инокуляции к периферии, формируя колонию. Для прикрепления к субстрату и потребления из него питательных веществ мицелий у некоторых видов образует корешкообразные выросты – ризоиды. К видоизменениям мицелия относят также склероции – округлые или продолговатые сплетения гифов, содержащие много питательных веществ, необходимых грибу при неблагоприятных условиях.

По строению мицелия грибы подразделяют на два класса.

Низшие грибы (фикомицеты). Этот класс характеризуется несептированным мицелием, который представлен

одной сильно разветвленной гигантской клеткой без перегородок и с многочисленными ядрами.

Высшие грибы (микомицеты). Характеризуются септированным мицелием: гифы мицелия разделены перегородками (септы, септиму) на отдельные одноядерные или многоядерные клетки. Цитоплазма одной клетки сообщается с цитоплазмой соседней через пору в центре перегородки. У некоторых высших грибов (дрожжи) мицелий отсутствует, а вегетативное тело представлено отдельными клетками с клеточной стенкой. Если в процессе деления или почкования дрожжевые клетки не расходятся, то образуются скопления клеток, которые называются ложным мицелием (псевдомицелием).

Размножение грибов. Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения.

Вегетативный способ. При этом способе размножение происходит без участия специальных органов, простым распадением мицелия на обособленные клетки:

а) хламидоспоры – концевые или интеркалярные – одноклеточные или многоклеточные участки гиф разнообразной формы с диаметром, превышающим длину исходной клетки;

б) оидии – отдельные, чаще овальной формы клетки с тонкой оболочкой, диаметр которых равен диаметру исходной гифы;

в) артроспоры – прямоугольные или многогранные, поднимаются вверх в виде четок над гифами воздушного мицелия и распадаются на отдельные клетки;

г) бластоспоры – округлой формы, формируются на мицелии путем почкования.

Вышперечисленные виды спор представляют собой формы измененного мицелия и способны при благоприятных условиях образовывать новый мицелий.

Репродуктивный способ. Это размножение при помощи специализированных органов, может быть бесполом и половым.

Бесполое размножение осуществляют особые клетки, которые развиваются эндогенно (спорангиоспоры, зооспоры) или экзогенно (конидии).

Спорангиоспоры – неподвижные, с твердой оболочкой, образуются обычно у низших грибов внутри шарообразных спорангиев, находящихся на особых ответвлениях гифов – спорангионосцах.

Зооспоры формируются в зооспорангиях у низших грибов, приспособленных к водному или полуводному образу жизни. Зооспоры обладают подвижностью.

Конидии образуются у высших грибов на специализированных ответвлениях гифов – конидионосцах. Конидии могут быть одноклеточными и многоклеточными, различной формы, окраски и разных размеров. Расположены одиночно или цепочками, а также в виде скоплений, образующих головку.

Половое размножение. В результате слияния ядер двух клеток и последующего редукционного деления образуются специализированные гифы с органами полового спороношения – сумками (асками) у аскомицетов и базидиями у базидиомицетов. Внутри аска развиваются аскоспоры, на поверхности базидии – базидиоспоры. К аскомицетам относят дрожжи, некоторые плесневые грибы; к базидиомицетам – шляпочные, головневые и др.

Грибы, способные к половому размножению, называют совершенными, развивающиеся без полового цикла – несовершенными (*Deuteromycetes*). У совершенных грибов в цикле развития отмечены стадии бесполого и полового спороношения.

Особенности строения некоторых низших и высших грибов. К типичным представителям фикомицетов относят

грибы рода *Mucor* (головчатая плесень). Размножаются фикомицеты половым путем, репродуктивным бесполом, а также оидиями и хламидоспорами. От несептированного мицелия отходят плодоносящие гифы спорангиеносцы со спорангием, внутри которого развиваются эндоспоры – спорангиоспоры. При созревании спорангии разрываются, и споры попадают в окружающую среду.

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

У грибов рода *Penicillium* (кистевая плесень) мицелий и конидиеносцы септированы. Конидиеносцы ветвятся в верхней части один или несколько раз, образуя кисточки, на которых развиваются метулы с мутовками фиалид (метулы – цилиндрические клетки, мутовки – пучки или скопления клеток, фиалиды – конидиогенные клетки). От фиалид в виде цепочек отшнуровываются конидии (рис.3).

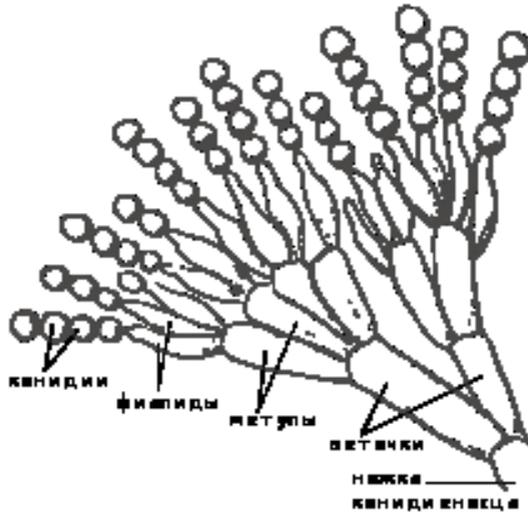


Рисунок 3 – Гриб рода *Penicillium*

Грибы рода *Aspergillus* (леечная плесень) характеризуются септированным мицелием и несептированными конидиеносцами с различной формы вздутиями на концах. На вздутиях расположены непосредственно фиалиды – носители цепочек конидий (головка одноярусная) или образуются метулы, на вершине которых развиваются пучки фиалид (головка двухъярусная). Головкой аспергилла называют вздутие конидиеносца с метулами, фиалидами и цепочками конидий (рис.4).

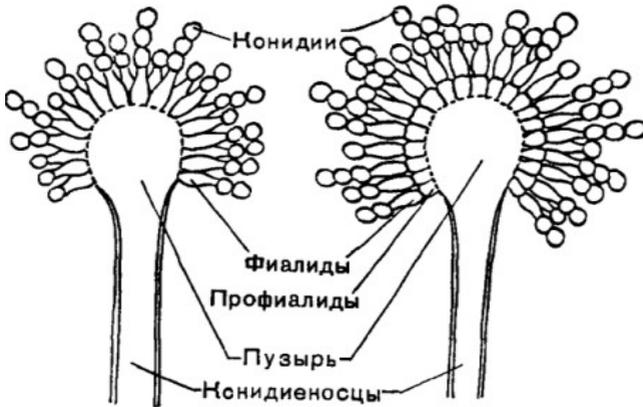


Рисунок 4 – Гриб рода *Aspergillus*

У грибов рода *Fusarium* мицелий септирован, обычно окрашен в розовый, фиолетовый или другой цвет. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии. Макроконидии состоят из нескольких крупных клеток веретенообразной или серповидной формы. Микроконидии чаще одноклеточные, редко с одной – двумя перегородками. Вегетативное тело грибов рода *Fusarium* иногда образует хламидоспоры, склероции.

Дрожжи — одноклеточные организмы округлой или удлинённой формы, с двухконтурной оболочкой и дифференцированным ядром. Их размножение происходит почкованием, половым путем, некоторые размножаются при помощи спор. В асках образуется от 4 до 12 спор. Оптимальной является температура 20–30°C, но многие из них способны развиваться при 10°C и вызывать порчу продуктов.

Дрожжи широко распространены в природе: почве, растениях, в воздухе, откуда они попадают на пищевые продукты и являются виновниками их порчи. В зависимости от вида дрожжей в продуктах происходит сбраживание углеводов, появляется прогорклый вкус у масла. Некоторые виды дрожжей способны развиваться даже в средах, содержащих 24-процентный NaCl.

В промышленности широко используются дрожжи рода *Saccharomyces*, который объединяет как «дикие или природные» штаммы, так и культурные, используемые в хлебопечении, в спиртовой и пивоваренной промышленности, сельском хозяйстве и быту. Они характеризуются различными биологическими свойствами, способностью сбраживать различные углеводы, интенсивностью брожения, количеством и концентрацией образуемого спирта.

Род *Saccharomyces cerevisiae* - крупные дрожжи округлой формы. Их применяют в промышленном производстве этилового спирта, хлебопечении, пиво- и квасоварении. Оптимальная температура брожения 28–30°C. Они неустойчивы к высокой концентрации сахара, соли, спирта в концентрации 12–14%. В каждом производстве применяют свои, специфические, расы данного вида дрожжей.

S. minor применяют преимущественно при выпечке ржаного теста. Клетки мелкие - 1,5–3 мкм, круглой формы, характерны фигуры почкования по 3–7 клеток. Оптимальная температура развития - 25–28°C. Отличаются кислото-

устойчивостью, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Род *Saccharomyces ellipsoideus* (*S. vini*) - дрожжи, как показывает название, эллипсоидной формы. Их используют преимущественно в виноделии, этот вид дрожжей также представлен многими расами. Но эти и некоторые другие виды рода *Saccharomyces* при случайном попадании в сырье и пищевые продукты, содержащие легко сбраживаемые углеводы, вызывают их порчу - скисание и брожение.

Дрожжи рода *Debaryomyces* являются возбудителями порчи колбасы, сосисок и других субстратов, богатых белком.

Для изучения морфологии дрожжей на лабораторном занятии можно использовать взвесь пекарских дрожжей в физрастворе, которые равномерно распределяются тонким слоем на предметном стекле. Их фиксируют физическим методом и окрашивают метиленовой синью в течение 3–5 минут. Дрожжевые клетки располагаются одиночно, имеют овальную форму, в молодой культуре часто обнаруживают почкующиеся дрожжи.

Обратите внимание, что морфологию дрожжей можно изучать уже при 400-кратном увеличении. При бактериологическом контроле качества дрожжевой закваски необходимо изучить их под иммерсией, так как при этом увеличении в загрязненной закваске можно обнаружить между крупными дрожжевыми клетками сопутствующую микрофлору, изучить ее и определить источники загрязнения по ходу технологического процесса.

Определение числа клеток, содержащих гликоген. Полисахариды в клетках дрожжей представлены гликогеном, имеющим вид гранул, расположенных в цитоплазме. Их выявляют при обработке клеток раствором Люголя. Зрелость дрожжей определяется по накоплению гликогена в цитоплазме.

Каплю взвеси изучаемой дрожжевой закваски наносят на предметное стекло и в нее добавляют каплю раствора Люголя. Каплю накрывают покровным стеклом, и получается препарат «раздавленная капля». Ее микроскопируют и изучают при увеличении в 400 и 900 раз. Микрокартина: гликогенopodobные полисахариды окрашиваются раствором Люголя в красновато-бурый цвет, а крахмалopodobное вещество (гранулеза) - в синий. Реакция на гликоген идет только в кислой среде, поэтому перед выявлением его в клетке, среду, где выращивали дрожжи, подкисляют. Количество дрожжевых клеток с гликогеном в закваске должно составлять не менее 70% от общего числа. Отсутствие гликогена в клетках дрожжей свидетельствует о том, что дрожжи незрелые, и перед применением такой закваски в производство ее надо освежить добавлением питательных веществ.

К представителям микроскопических грибов, являющихся виновниками порчи пищевых продуктов и кормов, относят *Cladosporium*, *Fusarium*, *Oidium lactis*, *Alternaria*, *Cladosporium*.

При микроскопии виден септированный мицелий и конидиеносцы. На питательном субстрате грибы образуют коричневые или черные бархатистые колонии. На воздушных гифах мицелия формируются овальные, расположенные в цепочку споры. Грибы хорошо растут при низких температурах и обладают высокой протеолитической активностью. Находясь на поверхности мяса, мясных продуктах, эта плесень проникает в толщу мышечной ткани. Плесень этого рода вызывает внутреннее плесневение масла (образование черных пятен) при наличии внутренних пустот. Может вызвать порчу сыра и яичных продуктов.

Среди грибов рода *Fusarium* есть сапрофиты, которые живут в почве и на растительных остатках, а патогенные паразиты вызывают заболевания многих видов расте-

ний - увядание, гниль корней, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян. При культивировании на питательной среде грибы рода *Fusarium* образуют войлочный септированный мицелий, обычно окрашенный в белый или розовый цвет, питательная среда под колониями имеет вишневый оттенок. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии. Макроконидии веретенообразной или серповидной формы, внутри имеют перегородки и состоят из нескольких крупных клеток, а микроконидии - чаще одноклеточные, грушевидной формы.

Oidium lactis на питательной среде образуют белый септированный мицелий. Оидии, в виде овальных клеток, отделяются непосредственно от кончиков мицелия. Молочная плесень имеет вид белого пушистого налета, появляется на поверхности молочных продуктов - сметане, твороге, кефире, в результате чего происходит снижение кислотности, приводящее к активизации гнилостных бактерий и порче продукта. При длительном хранении при низкой температуре могут развиваться схожие с *Oidium lactis* другие плесневые грибы, такие как *Candida* и *Oospora*.

Alternaria. От основных нитей мицелия гриба отходят короткие конидиеносцы, заканчивающиеся грушевидными или заостренными многоклеточными конидиями, окрашенными в оливковый, бурый цвет. Плесени этого вида могут развиваться на охлажденном и замороженном мясе, масле и других продуктах.

Особенности культивирования плесневых грибов. Для выращивания микроскопических грибов применяют специальные питательные среды - Сабуро, Чапека. При первичном выделении грибов из исследуемого материала в питательные среды для подавления сопутствующей микрофлоры добавляют пенициллин из расчета содержания

антибиотика 50 или 100 единиц в 1 мл среды, а стрептомицина - 0,1 г на 1 мл среды.

Питательные среды с антибиотиками готовят непосредственно перед использованием, добавляя к расплавленной и охлажденной до 50°C питательной среде растворами антибиотиков. Подозрительный по качеству исследуемый материал (пищевые продукты, корма, зерно) вносят на поверхность питательной среды в чашке Петри, выращивают при 28°C в течение 5–8 дней.

Для каждого вида гриба характерны свои культуральные особенности. Являясь строгими аэробами, они образуют на поверхности питательной среды крупные бархатистые, войлочные или кожистые колонии различной пигментации. По мере появления колоний изучают морфологические и культуральные свойства для дифференциации плесневых грибов.

Особенности микроскопического исследования грибов. Обычно грибы исследуют в неокрашенном состоянии. На предметное стекло наносят каплю жидкой смеси, состоящей из воды, этанола и глицерина в равных объемах. Фламбированной иглой или микологическим крючком берут кусочек мицелия, помещают в каплю жидкости на предметное стекло. Нити мицелия осторожно расплавляют препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом х40 при затемненном поле зрения.

Дрожжи микроскопируют аналогичным образом, а также готовят из них мазки, окрашенные простым методом.

Контрольные вопросы

1. Что представляют собой микроскопические грибы и сколько классов насчитывают?

2. Какие методы используют для микробиологического исследования микроскопических грибов?
3. В чем заключается практическое значение микроскопических грибов для животных и человека?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7 ПОДВИЖНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВКЛЮЧЕНИЯ

Цель занятия: ознакомить обучающихся с методами обнаружения жгутиков и определения подвижности бактерий.

Жгутики – структуры нитевидной формы, белковой природы, определяют способность клетки к движению в жидкой среде. Количество и характер расположения жгутиков у бактерий различны. У *монотрихов* один-два жгутика расположены на одном из полюсов клетки (*Pseudomonas*); у *лофотрихов* пучок жгутиков расположен полярно или субполярно (*Spirillum*); у *амфитрихов* жгутики расположены на обоих полюсах клетки; у *перитрихов* – по всей поверхности клетки (*Enterobacteriaceae*).

Монотрихи двигаются прямолинейно и поступательно, при необходимости могут изменить направление движения на 180° (клетка переворачивается). Движение *лофотрихов* прямолинейное вперед или назад. *Перитрихи* передвигаются хаотично.

Подвижные бактерии активно перемещаются в направлении, определяемом теми или иными внешними факторами. Такие направленные перемещения бактерий называют таксисами. В зависимости от фактора различают хемотаксис (частный случай - аэротаксис), фототаксис, магнитотаксис, термотаксис и вискозитаксис.

Наибольшее внимание привлекает изучение хемотаксиса, т.е. движения в определенном направлении относительно источника химического вещества. Для каждого организма все химические вещества в этом плане могут быть разделены на две группы: инертные и вызывающие таксисы (эффекторы). Среди последних выделяют аттрактанты (вещества, привлекающие бактерий) и репелленты (вещества, отпугивающие бактерий).

Аттрактантами могут быть сахара, аминокислоты, витамины, нуклеотиды и другие химические молекулы, а репеллентами - некоторые аминокислоты, спирты, фенолы, неорганические ионы. Бактерии легко детектируют изменение концентрации на 0,1-процентным при микромолярных концентрациях веществ, а диапазон детектируемых концентраций перекрывает пять порядков.

Аттрактантом для аэробных и репеллентом для анаэробных прокариот является молекулярный кислород. Аттрактанты часто представлены пищевыми субстратами, хотя не все вещества, необходимые для организма, выступают в качестве аттрактантов. Также не все ядовитые вещества служат репеллентами и не все репелленты вредны.

Аэротаксис - это движение микроорганизмов, одноклеточных, подвижных клеток многоклеточных организмов к источнику раздражения или от него. Источником раздражения в данном случае является кислород. Движение в сторону концентрации кислорода проявляется у аэробов, в обратную сторону - у анаэробов. Некоторые организмы в зависимости от концентрации кислорода могут проявлять как положительный, так и отрицательный таксис.

Определить аэротаксис у бактерий можно следующим образом. Под микроскопом наблюдается пробирка, в которой под стеклом находится капля воды. Аэробы скопятся у края стёклышка, анаэробы - в середине капли, бак-

терии, для которых наиболее благоприятна определённая кислорода среда (например, некоторые спириллы), скопляются на наиболее благоприятном для них расстоянии от края.

Фототаксис, то есть движение к свету или от него, свойственен, прежде всего, фототрофным бактериям. Механизм фототаксиса включает три основные стадии: поглощение света и первичная реакция в фоторецепторе; преобразование стимула и передача сигнала двигательному аппарату; изменение движения жгутиков. Различают положительный и отрицательный фототаксисы. Положительный фототаксис - движение в сторону источника света. Отрицательный фототаксис - движение в сторону от света.

Способность перемещаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита - *магнитотаксис* - обнаружен у разных бактерий, обитающих в пресной и морской воде.

У ряда бактерий обнаружен *вискозотаксис* - способность реагировать на изменение вязкости раствора и перемещаться в направлении ее увеличения или уменьшения.

За чувствительность бактерий к градиентам определенных факторов ответственны специфические рецепторы. Изучение хемотаксиса у *Escherchia coli* позволило обнаружить свыше 30 различных хеморецепторов, представляющий собой белки, синтезируемые независимо от присутствия индуктора или только в результате индукции.

Рецептор реагирует на эффектор и передает сигнал по определенному пути, конкретный механизм которого неизвестен, на «мотор» жгутика. Мембранные рецепторы группируются в кластеры, как правило, расположенные на полюсах клетки, однако это не может помочь бактерии уловить разницу концентраций между полюсами, поскольку она будет слишком маленькой из-за малого размера самой клетки. Вместо этого бактерии ориентируются в хи-

мических градиентах путем измерения временных изменений концентраций при движении. Обычно скорость движения *Escherichia coli* составляет 10—20 своих длин в секунду. Три класса белков участвуют в хемотаксисе: трансмембранные рецепторы, цитоплазматические сигнальные белки и ферменты адаптивного метилирования.

Жгуты легко повредить, поэтому препараты готовят с большой осторожностью. Стекла используют чисто вымытые, без царапин. Исследуемая культура должна быть не старше 12-18 часов. Бактериальную массу осторожно вносят в пробирку с несколькими миллилитрами физиологического раствора. Суспензию выдерживают 15-20 минут в термостате. Затем петлей каплю жидкости из пробирки осторожно переносят на предметное стекло, высушивают, фиксируют на пламени и окрашивают одним из специальных методов.

Метод серебрения по Морозову

Готовят четыре раствора. Раствор А: вода дистиллированная – 100 мл, 40-процентный раствор формалина – 2 мл, ледяная уксусная кислота – 1 мл. Раствор Б: танин – 5 г, жидкая карболовая кислота – 1 мл, вода дистиллированная – 100 мл. Раствор В: нитрат серебра – 5 г, дистиллированная вода – 100 мл. К 80 мл этого раствора по каплям добавляют аммиак до растворения осадка и образования легкой опалесценции. Для окраски раствор серебра разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10.

На препарат наносят раствор А на 1 минуту. Затем раствор сливают и препарат промывают водой, обрабатывают раствором Б и подогревают 1 минуту до отхождения паров. Промывают водой, после чего наносят раствор В и подогревают 1-2 минуты до появления коричневой окраски мазка. Затем промывают водой, подсушивают.

Микрокартина: тела бактерий угольно-черного цвета, жгутики в виде тончайших волнообразно извитых нитей коричневого или янтарно-черного цвета на прозрачном или желтоватом однородном фоне.

В повседневной бактериологической практике чаще используют косвенные методы обнаружения жгутиков – выявляют подвижность клеток исследуемой бактериальной культуры.

Препарат «раздавленная капля»

На чистое обезжиренное предметное стекло пастеровской пипеткой наносят 1-2 капли 18-20-часовой бульонной культуры, накрывают чистым покровным стеклом. Количество жидкости должно быть достаточным для заполнения всего пространства под покровным стеклом. Микроскопируют с объективом х40 или х90. Неокрашенные бактерии лучше видны при легком затемнении поля зрения, поэтому конденсор целесообразно опустить на 5-10 мм ниже плоскости предметного столика. Клетки видны в виде светлых или серых «теней». При объективе х90 четко видны только клетки, передвигающиеся в горизонтальной плоскости. Бактерии,двигающиеся вертикально, быстро уходят из зоны четкого изображения.

Препарат «висячая» капля

Каплю исследуемой культуры бактериологической петлей наносят на чисто покровное стекло. Берут специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре, края лунки смазывают вазелином, стекло переворачивают лункой вниз и прижимают к покровному стеклу таким образом, чтобы капля с бактериями была в центре лунки. Затем предметное стекло резко переворачивают, и капля висит над покровным стеклом в лунке. При мик-

роскопировании бактериальные клетки легче обнаружить по краю капли, где слой жидкости тоньше.

Активное движение бактерий необходимо дифференцировать от броуновского – колебаний клетки под ударами молекул воды и пассивного движения всех клеток с током жидкости в одну сторону при наличии уклона.

Помимо перечисленных методов для выявления жгутиков и подвижности прибегают к посеву исследуемой культуры уколом в полужидкий агар. Подвижные бактерии растут по всей питательной среде в пробирке, неподвижные – только по уколу.

Контрольные вопросы

1. Что отвечает за способность к движению бактерий?
2. Что представляют собой жгутики, их строение?
3. Опишите методы определения подвижности бактерий?
4. Какие факторы влияют на подвижность бактерий?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8 ЛАБОРАТОРНАЯ АППАРАТУРА. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Цель занятия: изучить лабораторную аппаратуру, ее назначение; ознакомиться и изучить методы стерилизации, классификацию, назначение и приготовление питательных сред.

Стерилизация (лат. *sterilis* – бесплодие, обеспложение) – процесс, вызывающий гибель патогенных и сапрофитных микроорганизмов и их форм (вегетативных и спорных) в каком-либо материале. В бактериологических лабораториях стерилизуют питательные среды, стеклянную посуду (пипетки, пробирки, чашки Петри, колбы и др.),

инструменты, ватные и марлевые тампоны. Для специальных условий асептической работы стерилизуют воздух и необходимые предметы в боксах. Для стерилизации используют физические и химические методы. Механизмы действия их неодинаковы, но при выборе любого из них должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации

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

Стерилизация сухим жаром включает в себя фламбирование и действие высокой температуры в виде сухого нагретого воздуха.

Фламбирование (прокаливание). Этим методом стерилизуют обычно металлические предметы: бактериологические петли, пинцеты и прочее.

Стерилизации сухим нагретым воздухом. Метод применяют для стерилизации чистой стеклянной посуды. Для этого используют печь Пастера (рис.5) – специальный сушильный шкаф с двойными стенками.

Снаружи он облицован теплонепроницаемым материалом. В его верхней части находится термометр. Между теплонепроницаемой обшивкой и внутренним металлическим корпусом на дне помещен автоматический электронагревательный элемент. При включении сушильного шкафа в электросеть воздух внутри него нагревается. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации. Режим стерилизации: при температуре 155-160°C – экспозиция 2 часа, при 165-170°C – 1-1,5 часа, при 180°C – один час. По истечении времени стерилизации

нагревание прекращают, и лишь тогда, когда температура снизится примерно до 45°C, шкаф открывают.



Рисунок 5 – Печь Пастера

Нельзя стерилизовать сухим жаром воспламеняющиеся вещества, питательные среды, резиновые предметы.

Стерилизация влажным жаром также включает в себя ряд методов.

Кипячение. Общепринятый метод стерилизации металлических инструментов (шприцев, игл, пинцетов, ножниц, скальпелей и прочего), некоторых резиновых и стеклянных предметов, которые складывают в стерилизаторы – специальные металлические ванночки с крышкой и вставной решеткой – подставкой. Эту подставку выстилают двумя-тремя слоями марли или тонким слоем гигроскопической ваты. Шприцы стерилизуют в разобранном виде, в иглы вставляют мандрены.

Режущие инструменты – лезвие скальпелей, ножниц обертывают марлей или ватой. В стерилизатор наливают воду, чаще всего, дистиллированную так, чтобы инстру-

менты были полностью погружены и добавляют 2-процентный раствор гидрокарбоната натрия. Стерилизатор закрывают крышкой. Кипятят 20-30 минут. После стерилизации воду осторожно сливают, а инструменты используют только после их охлаждения.

Стерилизация течучем паром. Этим методом стерилизуют питательные среды и другие материалы и вещества (желатин, углеводы), которые разрушаются при нагревании свыше 100°C. Способ дробной стерилизации при температурных режимах не выше 100°C был разработан Тендерем в 1877 году.

Однократное прогревание убивает только вегетативные формы бактерий. Оставшиеся жизнеспособными споры бацилл в периоды между стерилизацией прорастают в вегетативные формы. Стерилизация на следующий день инактивирует их. На третий день прогревание гарантирует полное обеспложивание материала.

Эффективность дробной стерилизации зависит от прорастания спор, а поэтому в промежутках между нагреванием материалы выдерживают при комнатной температуре (25°C). Для стерилизации используют текучепаровой аппарат Коха (рис.6) – одностенный металлический котел цилиндрической формы с двойным дном и крышкой с отверстиями для термометра и выхода пара.

Внутри котла расположена специальная подставка с отверстиями для стерилизуемого материала и нагревательные элементы. На дно аппарата наливают воду до уровня, о котором судят по показанию водомерной трубки.

Началом стерилизации считают момент закипания воды. Образующийся пар устремляется вверх непрерывной струей, соприкасаясь с обрабатываемым материалом.

Стерилизуют при 100°C 30-40 минут три дня подряд. Дробную стерилизацию при 100°C можно проводить в автоклаве, закрытого негерметично, при тех же режимах.



Рисунок 6 – Аппарат Коха

Тиндализация. Это дробная стерилизация при температурах ниже 100°C , которую проводят в водяной бане. Кратность прогрева зависит от температуры: при $70-80^{\circ}\text{C}$ – 3 дня, $60-65^{\circ}\text{C}$ – 5 дней, $56-58^{\circ}\text{C}$ – 6-7 дней. В первый день материалы стерилизуют 2 часа, в последующие дни 1 час. В промежутках между прогреваниями стерилизуемый материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор.

Коллоидные растворы, сыворотку крови, а также белкосодержащие вещества стерилизуют тиндализацией при $56-58^{\circ}\text{C}$, так как они разрушаются при более высокой температуре.

Автоклавирование. Это стерилизация паром под давлением в сочетании с высокой температурой в

специальном аппарате – автоклаве. При встрече насыщенного пара с более холодным объектом пар конденсируется, превращаясь в воду, в результате чего выделяется большое количества тепла. Кроме того, уменьшается объем пара, что способствует его проникновению во внутренней части стерилизуемого материала.

Обязательное условие – поступление действительно насыщенного пара, чтобы его соприкосновение с холодным предметом вело к немедленной конденсации и нагреванию. Промышленность выпускает автоклавы вертикальные и горизонтальные.

Вертикальный автоклав – это двустенный металлический котел цилиндрической формы, закрываемый герметично крышкой. Между стенками через специальный кран с воронкой заливают воду до определенного уровня. Внутренняя стенка котла в верхней части снабжена отверстиями, в нижней части котла – краном, через который при нагревании воды пар вытесняет воздух из котла.

Сверху на автоклав надевают металлический защитный каркас. Причем между ним и самим автоклавом должно быть свободное пространство. Автоклав нагревают включением в электросеть.

Автоклав загружают стерилизуемым материалом, закрывают крышку и кран, через который заливали воду, нижний кран временно оставляют открытым. Нагреваемая вода между стенками автоклава кипит. Образующийся пар поднимается вверх и через верхние отверстия внутренней стенки проходит внутрь котла, толчками вытесняя воздух через нижний открытый кран. Когда воздух весь вытеснен и пар начинает выходить ровной струей, нижний кран закрывают. В результате давление пара внутри автоклава повышается.

Началом стерилизации считают момент, когда давление достигает заданной величины. Нагрев регулируют на протяжении всей стерилизации, поддерживая давление пара на одном уровне. При чрезмерном повышении давления внутри автоклава предусмотрен предохранительный клапан, через который избыток пара автоматически выходит наружу.

При повышении давления пара соответственно повышается и температура в автоклаве: $0,505 \cdot 10^5$ Па (0,5 атм.) – температура 110-112°C; $1,01 \cdot 10^5$ Па (1 атм.) – 120-121°C; $1,515 \cdot 10^5$ Па (1.5 атм.) – 124-126°C; $2,02 \cdot 10^5$ Па (2атм) – 132-133 °С.

Манометр показывает давление пара без учета окружающего атмосферного давления (760 мм. рт. ст.). По истечении времени стерилизации автоклав отключают. После остывания при нулевом показании манометра открывают кран для спуска пара. Крышку открывают осторожно на себя, не заглядывая в котел, оберегая лицо и глаза от возможного остаточного пара. До полного выхода пара открывать крышку нельзя, так как при быстром падении давления внутри автоклава стерилизуемые жидкие среды закипают и выталкивают из пробирок пробки вместе с жидкостью.

Автоклавированием стерилизуют питательные среды, выдерживающие нагревание выше 100°C (МПА, МПБ), а также физиологический раствор, стеклянную посуду, завернутую в бумагу, перевязочный материал и спецодежду, сложенные в металлические боксы; обеззараживают использованные бактериальные культуры.

При обеззараживании режим работы автоклава 1,5 атм. – 1 час, при стерилизации чистого материала 0,5 атм. – 30-40 минут. Температуру в автоклаве контролируют с помощью контактных термометров, а также химических веществ с различной точкой плавления. Эти вещества по-

мещают в автоклав в пробирках (пастеровских пипетках) с добавлением краски (фуксин, метиленовая синь). Пробирки запаивают и устанавливают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. При определенной температуре вещество-индикатор плавится и приобретает цвет красителя.

Эффективность стерилизации проверяют высевом спорowego материала, который предварительно выдерживают в автоклаве вместе со стерилизуемыми объектами. После инкубирования в термостате в течение нескольких дней среды должны остаться стерильными.

Горизонтальный автоклав отличается от вертикальной конструкции, но принцип действия тот же.

Пастеризация. Этот метод предложил Пастер для сохранения питательной ценности пищевых продуктов (молоко, мясные, рыбные и овощные консервы), которая снижается при кипячении (разрушаются витамины и некоторые другие вещества). При пастеризации продукт нагревают до 80°C 30 минут, затем резко охлаждают (до 4-8 °C).

Крупные предприятия оснащены специальными пастеризаторами с охлаждающей системой. Пастеризация снижает количество бактерий: погибают вегетативные формы, а споры сохраняются. Резкое охлаждение и последующее хранение при низкой температуре 4-5°C препятствуют прорастанию спор и последующему размножению бактерий.

Ультрапастеризация (от латинского *ultra* - сверх, чрезмерно, + пастеризация) - это процесс термической обработки с целью продлить срок годности продукта питания.

Ультрапастеризации обычно подвергается сырое молоко и фруктовые соки. Жидкость на 2-3 секунды нагревают до температуры 135-150 °C и тут же охлаждают до 4-5 °C. При этом патогены и микроорганизмы уничтожаются

полностью. Молоко после такой обработки хранится 6 недель и дольше при комнатной температуре.

Из молока, таким образом, убирается микрофлора и споры бактерий, которые приводят к скисанию молока, а природные полезные свойства сохраняются с минимальными потерями.

Процесс ультрапастеризации происходит в закрытой системе. Есть специальные установки. Длительность - около двух секунд.

Применяют два способа ультрапастеризации:

- контакт жидкости с нагретой поверхностью при температуре от 125-140 °С;
- прямое смешивание стерильного пара при температуре от 135-140 °С.

Стерилизация фильтрованием – метод, с помощью которого обычно стерилизуют жидкости, не выдерживающие нагревания (сыворотки крови, растворы антибиотиков и другие). Жидкости пропускают через бактериологические фильтры. Фильтрование происходит за счет перепада давления, вызванного созданием вакуума в приемнике фильтрата. Действие фильтра состоит в механической задержке и адсорбции микроорганизмов стенками пор фильтра. Однако следует помнить, что размеры микробов часто бывают меньше среднего диаметра пор фильтров.

Фильтры выпускают твердые керамические цилиндрической формы в виде «свечей» и асбестовые – в виде пластинок и мембранные – с наиболее точной калибровкой пор.

Керамические фильтры (Шамберляна, Беркефельда) производят из смеси каолина и кварцевого песка.

Асбестовые фильтры (Зейтца) – плотные пластины, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. Отечественные асбестовые фильтры обозначаются марками Ф₂ и СФ. К стерилизующим относят фильтры марки СФ.

Мембранные фильтры (коллоидные мембраны, ультрафильтры) представляют собой тончайшие листки из обработанной определенным образом гемицеллюлозы. Фильтры выпускают с порами различного диаметра. Применяют для фильтрации, концентрации веществ, содержащихся в фильтруемом материале, а также для определения размеров вирусов.

Большой частью в работе используют фильтры Зейтца и мембранные фильтры. Фильтры монтируют в специальный держатель-воронку, который вставляют в пробку колбы Бунзена (толстостенная колба с тубусом). Смонтированный фильтр обертывают бумагой и стерилизуют в автоклаве.

Фильтруемую жидкость наливают в воронку над фильтром. На тубус колбы надевают резиновую трубку (шланг), присоединенную к ручному или электрическому насосу. Выкачиванием воздуха из колбы создают пониженное давление и фильтруют жидкость. Бактерии остаются на фильтре. Стерильность полученных фильтратов проверяют посевом на питательные среды с последующим инкубированием в термостате в течение нескольких дней.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами - метод, применяемые для обеззараживания воздух в помещениях (боксах, операционных). В лаборатории источником УФ-лучей обычно служат специальные бактерицидные лампы, которые также нашли применение в пищевой промышленности при хранении различных продуктов (температуре выше 0°C).

Стерилизация ультразвуком – метод, который используют для обеззараживания воды, молока, некоторых продуктов, а также козювенного сырья. Стерилизующее действие ультразвука связано с возникновением в цитоплазме бактерий кавитационных пузырьков, заполненными парами под действием около 10 тыс. атм., вследствие чего

разрушаются внутренние структуры бактериальной клетки.

Химические методы стерилизации

Химические методы сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром. Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25-0,5-процентным раствором фенола, 0,5-процентным раствором хлороформа, 0,5-процентным раствором формалина или раствором мертиола (в конечном разведении 1:5000 – 1:10 000).

Для консервирования агглютинирующих сывороток используют борную кислоту, толуол, глицерин.

Подготовка посуды для стерилизации. Лабораторная посуда должна быть чисто вымытой и пастеризованной. Для мытья используют растворы мыла и химические моющие средства. Новую посуду предварительно кипятят в 1-2-процентном растворе соляной кислоты, чтобы избежать последующего выщелачивания стекла. Вымытую в проточной воде посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Бактериологические пробирки, конические, матровые колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, состоящими из плотно скрученных валиков ваты, покрытых слоем марли. Для бактериологических пробок также разработаны металлические пробки в виде наружных колпачков. Следует учитывать, что стерилизация ватных пробок при высокой температуре приводит к выделению из ваты веществ, ингибирующих рост некоторых чувствительных бактерий, например, бруцелл.

При монтаже мерных пипеток, пипеток Пастера в верхний конец вставляют ватный тампон. У пипеток Пастера должен быть запаян капилляр. Каждую мерную пипетку заворачивают длинной полоской бумаги шириной 4-5 см, начиная с носика, винтообразно, по всей длине. Пипетки Пастера заворачивают в бумагу по 10-20 штук, пробирки – по 15-20 штук. Все виды пипеток лучше хранить до и после стерилизации в специальных металлических пеналах. Пробки на колбах дополнительно покрывают колпачками из бумаги.

Чистые чашки Петри в собранном виде перед стерилизацией заворачивают в бумагу по 3-4 штуки. После стерилизации бумага предохраняет стерильную посуду от загрязнения микрофлорой.

Посуду в сушильном шкафу перед стерилизацией размещают не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха. Следят, чтобы температура не превышала 180°C, так как при более высокой температуре бумага и вата будут обугливаться. После окончания стерилизации сушильный шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до 70-80 °C, поскольку резкий температурный перепад может привести к разрушению стекла.

Если посуда предназначена для стерилизации в ней питательных сред автоклавированием под давлением не менее 1 атм., то ее предварительно стерилизуют. При стерилизации сред текучим паром или в атоклаве под давлением не более 0,5 атм. необходимо использовать стерильную посуду.

Питательные среды

К любой питательной среде предъявляют ряд основных требований:

- 1) стерильность;
- 2) содержание необходимых факторов – источников энергии, углерода, азота, серы, а также неорганических ионов – обязательно в форме, доступной для усвоения микроорганизмами;
- 3) оптимальные значения ряда биофизических показателей: концентрации водородных ионов (pH), окислительно-восстановительного потенциала (Eh), активности воды, осмотического давления.

Классификация питательных сред и способы их приготовления. Питательные среды классифицируют в зависимости от исходных компонентов, консистенции, целевого назначения, химического состава.

В зависимости от химического состава и исходных компонентов различают следующие типы питательных сред:

1. Среды неопределенного химического состава. Их подразделяют на:

а) среды животного происхождения (исходные продукты – мясо, рыба, молоко и т.д.);

б) среды растительного происхождения (исходные продукты – соя, горох, картофель, морковь и т.д.)

Некоторые продукты используют в натуральном виде, но чаще животные и растительные ткани подвергают различной обработке.

2. Среды известного химического состава (синтетические). В них входят известные химические соединения (соли, углеводы, аминокислоты, витамины и т.д.) в оптимальном количественном соотношении. Синтетические питательные среды используют, когда выращиваемую клеточную массу необходимо максимально освободить от

балластных органических соединений, входящих в состав обычных сред (например, при получении диагностических аллергенов или при изучении метаболических потребностей микроорганизма в том или ином конкретном химическом соединении).

По консистенции питательные среды дифференцируют на плотные, полужидкие и жидкие.

Жидкие питательные среды. Данные среды готовят, используя экстракты, гидролизаты, растворы исходных продуктов.

Полужидкие и плотные питательные среды. Необходимую консистенцию среде придают добавлением различных уплотнителей.

Агар-агар – полисахарид, продукт переработки некоторых морских водорослей. Плавится при 80-86°C, затвердевает при 40°C. Для получения плотных сред его добавляют в количестве 1,5-2%, реже 3%; полужидких – 0,3-0,7%.

Желатина – экстракт из тканей, содержащих много коллагена. Желатиновый гель плавится при температуре 25°C, что делает его неудобным для выращивания микроорганизмов с температурным оптимумом 37-38°C. Кроме того, ряд бактерий выделяют протеолитические ферменты, разлагающие желатину. Обычно в питательные среды вносят 10-20% желатины.

По целевому назначению различают общеупотребительные (основные), обогащенные, специальные, элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические питательные среды.

Общеупотребительные (основные) среды. Их применяют для культивирования относительно неприхотливых микроорганизмов.

В качестве исходных компонентов для приготовления основных сред используют наиболее часто мясную во-

ду, перевар Хоттингера, растительные гидролизаты (мясная вода, перевар Хоттингера, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон).

Широко используют культивирование микроорганизмов на плотных питательных средах в чашках Петри. Диаметр стандартной чашки Петри около 100 мм. Выпускают чашки меньшего и большего диаметров, а также одноразовые пластиковые. В стандартные стерильные чашки Петри над пламенем горелки наливают около 20 мл расплавленного и охлажденного до 45-50°C питательного агара. Чашки помещают на горизонтальную поверхность до застывания агара (полужидкий мясо-пептонный агар, мясо-пептонная желатина, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, питательный бульон, питательный агар).

Обогащенные среды. Многие виды болезнетворных бактерий плохо растут на общеупотребительных питательных средах. Поэтому в основные среды добавляют кровь, сыворотку крови, углеводы и т.д. Такие питательные среды получили название обогащенных (сывороточный и кровяной агара, сывороточный и кровяной бульоны, углеводные среды).

Специальные среды. Так называют среды, разработанные с учетом специфических ростовых потребностей ряда бактерий (среда Мак-Коя для возбудителя туляремии, среда Терских для культивирования лептоспир).

Элективные среды. Это питательные среды для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида из материалов, содержащих несколько видов микробов. Элективные среды чрезвычайно многообразны по своему составу. В них включают компоненты, обеспечивающие преимущественный рост искомого микроорганизма и (или) подавляющие в той или иной степени рост сопутствующей микрофлоры.

По консистенции среды данного типа могут быть плотными и жидкими. Жидкие элективные среды называют средами обогащения или накопления. Их применяют, когда ставят цель увеличить количество искомого микроорганизма в смешанной популяции (молочно-солевой агар, среда Шустовой, среда Раппопорт, среда Мюллера, среда Кауфмана, казеиново-угольный агар).

Дифференциально-диагностические среды. Данные среды предназначены для выявления ферментов у микроорганизмов. По консистенции они могут быть жидкими, полужидкими, плотными. В состав этих сред входят основная питательная среда, обеспечивающая рост изучаемого микроорганизма, субстрат для обнаружения фермента и индикатор, по изменению цвета которого судят о сдвиге рН среды в результате расщепления субстрата.

К питательным средам такого типа относят среды Гисса, Эндо, Плоскирева, Левина, висмут сульфит агар.

Плотные дифференциально-диагностические среды применяют для первичной изоляции возбудителей из материала. В их состав нередко кроме известного субстрата входят вещества, придающие питательной среде селективные свойства.

Специальные среды (среды нового поколения).

Хромогенные среды – это среды нового поколения, позволяющие проводить быстрое обнаружение и идентификацию микроорганизмов. Они основаны на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов.

Принцип действия хромогенных питательных сред определяется взаимодействием высокоспецифических ферментов бактерий с хромогенным субстратом, введённым в состав среды и играющим в ней роль индикатора. В результате этого взаимодействия хромогенный субстрат расщепляется под действием фермента искомого микроор-

ганизма, выделяя в среду хромофор, окрашивающий колонию. Микроорганизмы, не продуцирующие высокоспецифический фермент, остаются неокрашенными, поскольку хромогенный индикатор не расщепился.

Практическая значимость. Идентификация возбудителя с помощью хромогенных питательных сред происходит одновременно с его выделением и не требует постановки дополнительных тестов, что значительно сокращает время и материальные затраты на исследование.

Контрольные вопросы

1. Что относится к лабораторной посуде в микробиологической лаборатории?
2. Какие методы стерилизации используют в практике?
3. Что такое пастеризация и где ее применяют?
4. Почему автоклавирование наиболее эффективный способ стерилизации?
5. Назовите питательные среды для выращивания микроорганизмов.
6. Что входит в основу питательных сред?
7. Как классифицируют питательные среды?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9 ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Цель занятия: освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды, а также и методы выделения чистых бактериальных культур. Изучить основные культуральные характеристики микроорганизмов и методы определения количества бактерий.

Культура микроорганизмов – это популяция (расплодка) клеток на питательной среде. Посев и пересев культур микроорганизмов на питательные среды – наиболее частый методический прием, который используют для первичного выделения микроорганизма из какого-либо объекта, а также для поддержания культур в жизнеспособном состоянии в лабораторных условиях.

Чистая культура – это популяция бактерий одного вида или биологического варианта (биовара), выращенная на питательной среде.

Штаммы – чистые культуры микроорганизмов одного вида, выделенные из разных объектов или из одного и того же объекта, но в разное время.

Колония – макроскопически видимое скопление клеток микроорганизма на поверхности или внутри плотной питательной среды, образовавшейся в результате размножения одной жизнеспособной клетки. По этой причине колонию обычно рассматривают как чистую культуру микроорганизма.

Техника посева микроорганизма. Посевы из нативного материала чаще проводят пастеровской пипеткой, из культур микроорганизмов – бактериологической петлей в зоне стерильного воздуха над пламенем горелки. На куль-

туральных сосудах (пробирки, чашки Петри, колбы и т.д.) пишут номер экспертизы, под которым зарегистрирован материал, дату посева.

Посев на жидкую питательную среду. Пробирку с исследуемым материалом и пробирку с питательной средой держат в левой руке, в правую руку берут бактериологическую петлю или пипетку и пробки от пробирок. Над пламенем горелки обжигают края пробирок. Бактериологическую петлю (пипетку) вводят в пробирку с материалом. Переносят материал в пробирку со стерильной питательной средой и стряхивают с петли в среду, не смачивая при этом петледержатель. Края пробирок вновь проводят над пламенем горелки. Закрывают пробирки пробками, стерилизуют петлю и ставят ее в штатив. Использованную пипетку опускают концом вниз в банку с дезинфицирующим раствором.

Посев на плотную питательную среду. Выполняют разными способами.

1. При посеве в пробирку пробирки с засеваемой микробной культурой и питательной средой (МПА) берут в левую руку. Пробирку с МПА держат скошенной поверхностью среды вверх. В открытую у пламени пробирку с микробной культурой (или другим материалом) вводят простерилизованную бактериологическую петлю, слегка прикасаясь петлей к поверхности среда (материала). Берут материал, переносят его в пробирку со стерильной питательной средой. Петлю опускают до дна пробирки, погружают в конденсационную жидкость и зигзагообразным движением проводят снизу-вверх по поверхности среды (посев «штрихом»). Пробирки закрывают пробками, петлю прожигают. Пробирки с посевами ставят в термостат.

2. При посеве уколом в столбик среды пробирку с плотной (нескошенной) средой берут в левую руку. Над пламенем горелки извлекают из пробирки пробку. Петлей

с материалом прокалывают вертикально по центру пробирки питательную среду. Петлю вынимают, прожигают. Пробирку с засеянной средой закрывают пробкой (рис. 7).

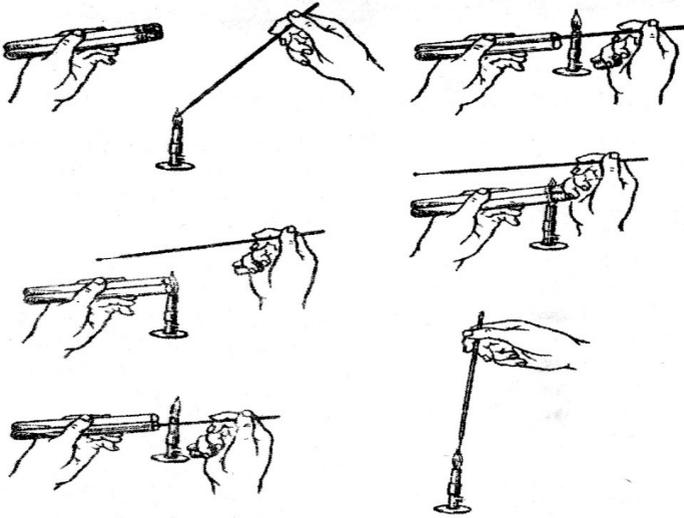


Рисунок 7 – Техника посева микроорганизмов в пробирку

При посеве на чашку Петри, чашку берут в левую руку. Большим пальцем левой руки слегка приподнимают крышку. Обжигают на пламени горелки края чашки в зоне щели. Вносят посевной материал на поверхность питательной среды. Затем растирают его при помощи стеклянного шпателя или бактериологической петли (рис.8).

Посев на полужидкую питательную среду. Выполняют методом укола в столбик питательной среды.

Выделение чистых культур микроорганизмов. При бактериологическом исследовании искомый микроорганизм обнаруживают в материале, как правило, в смеси с бактериями других видов. Классическими методами бактериологии возможно идентифицировать микроорганизм

только при условии, что он находится в виде чистой культуры.

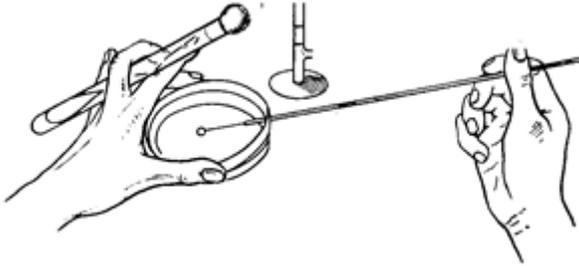


Рисунок 8 – Посев бактерий в чашку Петри

Метод Пастера (метод разведений). Из исследуемого материала готовят ряд последовательных (десятикратных) разведений на стерильной жидкой питательной среде в пробирках или колбах ($10^1 - 10^{10}$). Предполагается, что количество микробных клеток в каждом последующем разведении будет меньше, чем в предыдущем, и в какой-то из пробирок останется только одна микробная клетка, которая и даст начало чистой культуре микроорганизма. Однако для успешного применения этого метода необходимо, чтобы искомым микроорганизм в материале количественно преобладал над сопутствующими видами.

Метод Коха (метод заливок). Исследуемый материал в небольшом количестве вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до $45-50^\circ\text{C}$ МПА и перемешивают. Затем каплю питательной среды вносят во вторую пробирку с расплавленным МПА и т.д. Количество разведений зависит от предполагаемой численности микроорганизмов в исследуемом материале. Затем содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды чашки помешают в термостат. Фиксированные в плотной среде микробные клетки при размножении

формируют колонии, из которых можно отвить (пересечь) чистую культуру микроорганизма.

Метод Дригальского. Берут три-пять чашек Петри с плотной питательной средой. В одну из чашек вносят посевной материал и распределяют шпателем по поверхности питательной среды. Не обжигая шпатель, оставшийся на нем материал, последовательно растирают на поверхности среды во второй, третьей и остальных чашках. В последних чашках Петри после инкубирования в термостате обычно наблюдают формирование изолированных колоний бактерий (рис.9).

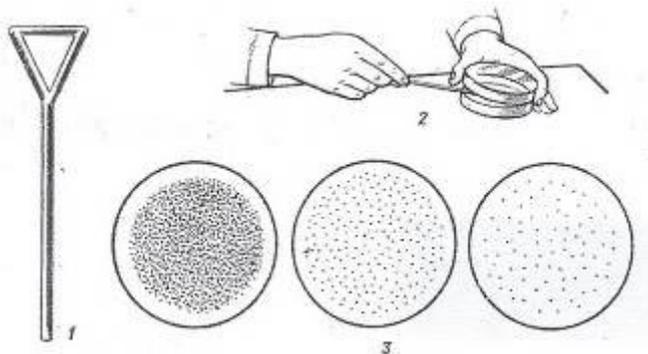


Рисунок 9 – Выделение чистой культуры методом Дригальского

Более экономичен следующий способ получения изолированных колоний. Бактериологической петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри с питательным агаром. Петлю прожигают в пламени горелки, дают остыть и часть материала из первого сектора аналогичным образом распределяют во втором секторе, затем в третьем и четвертом секторах. Даже при расसेве бактериальной массы из

колоний в четвертом секторе при таком способе получают рост изолированных колоний (рис.10).



Рисунок 10 - Метод выделения чистой культуры Дригальского (способ 2)

Методы, основанные на биологических особенностях микроорганизмов. Направлены на подавление роста сопутствующей микрофлоры.

Прогревание: при выделении чистой культуры спорообразующего вида бактерий исследуемый материал прогревают при 80°C в течение 20 минут или кратковременно кипятят. Вегетативные клетки сопутствующей микрофлоры в этих условиях погибают, а споры искомого микроорганизма сохраняют жизнеспособность и прорастают после посева на питательные среды.

Использование селективных питательных сред, которые содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры (антибиотики, красители и т.д.), - частный прием при исследовании контаминированного материала. Однако необходимо учитывать, что селективный фактор часто находится не в бактерицидных, а в бактериостатических концентрациях. Поэтому клетки сопутствующей

щих микроорганизмов не растут, но остаются жизнеспособными на поверхности питательной среды, и при отливке колоний исследуемой культуры на обычные среды могут быть причиной получения смешанной культуры.

Биопроба – заражение чувствительных лабораторных животных. Это метод, с помощью которого не только выделяют возбудитель из патологического материала, но также изучают вирулентность чистой культуры. Организм животного с его защитным фактором служит биологическим «фильтром», который уничтожает сопутствующую непатогенную микрофлору, но не способен подавить размножение вирулентных бактерий, что позволяет достаточно легко выделить возбудитель в чистой культуре из тканей погибшего или убитого с диагностической целью животного.

При выделении чистых культур некоторых видов бактерий используют их другие биологические особенности. Например, способность микроорганизма расти при низких (листерии) или высоких (термофильных бактерий) температурах, которые лежат за пределами температурных диапазонов сопутствующих видов бактерий. Для выделения культуры *Proteus vulgaris* используют способность данного вида давать ползучий рост на поверхности плотной питательной среды. С этой целью материал, содержащий *Proteus vulgaris*, засевают в конденсационную воду на дне пробирки со скошенным МПА, не касаясь поверхности среды. Сопутствующая микрофлора растет в нижней части питательной среды, а протей в виде прозрачной пленки распространяется вверх.

Для выделения *Clostridium tetani* материал засевают точечно на плотную питательную среду в чашках Петри и после выращивания отвивают культуру с периферии ползучего роста.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под культурой микроорганизмов?
2. Опишите технику посева микроорганизмов на жидкие питательные среды.
3. Какие методы используют для выделения чистой культуры микроорганизмов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ МИКРОБОВ

Цель занятия: изучить методы изучения культуральных и биохимических свойств бактерий.

Культуральные свойства микроорганизмов

В процессе идентификации наряду с другими свойствами у микроорганизмов изучают культуральные признаки – особенности роста на плотных, жидких и полужидких питательных средах при определенных условиях.

На плотных средах изучают колонии микроорганизмов. Бактерии каждого вида формируют колонии с определенными признаками, которые учитывают при индикации.

Размер колонии: крупные – диаметром 4-6 мм и более, средние – 2-4 мм, мелкие – 1-2 мм и точечные колонии диаметром менее 1 мм.

Форма колоний может быть правильной круглой, неправильной (амебовидной, розеткообразной), корневидной.

Цвет зависит от способности микроорганизма образовывать пигмент: белый, желтый, красный, сине-зеленый

и т.д. Бактерии, не синтезирующие пигмент, формируют бесцветные колонии.

Характер поверхности: шероховатая, блестящая, матовая, сухая, влажная, гладкая, радиально или концентрически исчерчена.

Края колонии могут быть ровными, волнистыми, зубренными, бахромчатыми. Их исследуют невооруженным глазом и под малым увеличением микроскопа.

Рельеф (профиль) определяют, рассматривая колонию сбоку. Различают плоские, конусообразные, куполообразные, плоские с конусовидным центром или углублением в центре колонии, с утолщенными (валикообразными) краями.

Прозрачность колонии: непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная.

Структура может быть однородной, зернистой, волокнистой и т.д. Ее выявляют при слабом увеличении микроскопа.

Консистенция может быть пастообразной, слизистой, плотной (сухой) и т.д. Ее определяют, дотрагиваясь до колонии бактериологической петлей. Колоний некоторых видов врастают в толщу питательной среды, что также определяют при помощи бактериологической петли.

Запах: многие виды бактерий в процессе роста на питательных средах выделяют специфические ароматические вещества.

В жидких средах учитывают следующие признаки: степень помутнения среды (интенсивное, среднее, слабое), наличие или отсутствие пристеночного кольца на границе мениска и внутренней поверхности пробирки, характер поверхностной пленки (толщина, цвет, поверхность), характер осадка (обильный, скудный, компактный, хлопьевидный, слизистый). При характеристике осадка пробирку слегка встряхивают и учитывают результат: осадок разби-

вается в гомогенную равномерную суспензию; образуются мелкие, крупные хлопья, глыбки. Слизистый осадок при встряхивании обычно поднимается в виде косички. Пигментообразующие микроорганизмы вызывают окрашивание питательной среды и осадка (желтое, зеленоватое, красное и т.д.).

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 сахаролитических свойств микроорганизмов. В состав дифференциально-диагностических углеводных сред (среды Гисса) 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 регистрируется по изменению рН 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 рН до голубого или ярко-синего в кислой среде.

Индикатор Андрэдэ 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 24-48 часов, а окончательный – через 10-14 суток инкубирования посевов.

Тест с метиловым красным показывает степень закисления среды при расщеплении глюкозы.

Тест Фогес-Проскауэра выявляет промежуточный продукт расщепления глюкозы – ацетоин. Положительная реакция – красное окрашивание среды.

Выявление протеолитических свойств бактерий. Протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Характер роста микроорганизма на молоке. При посеве исследуемой культуры бактерий на стерильное обезжиренное молоко можно выявить фермент, расщепляющий молочный сахар (лактозу) и протеолитические ферменты, действующие на молочный белок (казеин). Расщепление

лактозы приводит к закислению и свертыванию молока. При выделении протеолитических ферментов казеин постепенно растворяется – пептонизируется, в результате чего молоко просветляется, приобретает легкий кремовый оттенок, а на дне пробирки формируется осадок. Свертывание молока может также происходить под влиянием выделяемого некоторыми бактериями «сычужного» фермента. В этом случае реакция молока бывает щелочной. Иногда возможна пептонизация казеина без свертывания молока.

Тест на гидролиз казеина на плотных питательных средах. Обезжиренное молоко диализируют для удаления лактозы, которая ингибирует (задерживает) гидролиз казеина. В расплавленный питательный агар с двойной концентрацией агар-агара добавляют равный объем стерилизованного автоклавированием диализованного молока. Исследуемую культуру бактерий засевают «штрихом» на поверхность питательной среды, разлитой в чашки Петри. Посевы инкубируют до 14 суток. Перед учетом результатов поверхность среды заливают 10-процентным раствором соляной кислоты. Положительный результат – просветление среды вокруг колоний.

Тест на желатиназу. Культуру микроорганизма засевают уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12-процентный желатины. После культивирования опытную и контрольную пробирки охлаждают под холодной водой и по «текучести» желатины делают заключение о наличии фермента.

Тест на сероводород (H_2S). Узкие полоски фильтровальной бумаги смачивают в 5-процентном растворе ацетата свинца, высушивают, стерилизуют. Культуру микроорганизма засевают в питательную среду в пробирке, после чего индикаторную бумагу помещают в пробирку (она не должна касаться среды) и закрепляют пробкой. Выде-

ляющийся сероводород реагирует с ацетатом свинца, и образующийся сульфид свинца вызывает почернение бумаги (положительный результат).

Тест на индол (C_8H_7N). Исследуемую культуру целесообразно выращивать на средах, богатых триптофаном, при расщеплении которого образуется индол. К выращенной культуре добавляют 1-3 мл эфира, встряхивают, отстаивают и вносят 0,5 мл реактива Эрлиха. Через 5 минут учитывают результат. Появление на границе эфира и питательной среды красно-фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии индола.

Обнаружения индола проводят при помощи индикаторной полоски, пропитанной насыщенным раствором щавелевой кислоты, фиксируют над бактериологическим посевом. При выделении индола на вторые-третьи сутки после посева нижняя часть полоски бумаги приобретает розовый цвет в результате соединения индола со щавелевой кислотой.

Тест на аммиак (NH_3). Исследуемую культуру засевают в жидкую питательную среду в пробирке. Между пробкой и стенкой пробирки закрепляют полоску розовой лакмусовой индикаторной бумажки. Посевы инкубируют в термостате 1-5 суток. Посинение лакмусовой бумажки свидетельствует о выделении аммиака.

Тест на уреазу. Исследуемую культуру микроорганизма засевают на среду Кристенсена и выращивают 1-4 суток. Положительный результат – покраснение среды в результате ее защелачивания.

Тест на редукцию нитратов. Выявляет восстановление нитратов в нитриты. Культуры микроорганизмов засевают на МПБ, содержащий 0,2-процентного нитрата калия и инкубируют 48-72 часа. Затем в опытную и контрольные пробирки добавляют по 1 мл реактива с крахмалом. К этому раствору перед постановкой реакции добавляют не-

сколько капель 10-процентного раствора соляной кислоты. Положительный результат – темно-синее окрашивание.

Тест на общую фосфатазу. Исследуемую культуру микроорганизма засевают «шрихом» на поверхность питательного агара с натриевой солью дифосфата фенолфталеина, инкубируют 4-5 суток. Чашки переворачивают вниз крышкой, на внутреннюю поверхность которой наносят каплю 28-30-процентного раствора нашатырного спирта. При наличии фосфатазы колонии приобретают красный цвет.

Тест на каталазу. Бактериальную массу снимают с поверхности агара бактериологической петлей и суспендируют в капле 3-процентного раствора перекиси водорода на предметном стекле. Положительный результат – образование пузырьков газа.

Тест на оксидазу. Фильтровальную бумагу пропитывают 1-процентным раствором тетраметилпарафенилендиамина дегидрохлорида. Бактериальную массу петлей наносят на поверхность бумажной полоски. Положительный результат – фиолетовое или пурпурное окрашивание через 1-60 секунд.

Определение редуцирующих свойств бактерий. Реакция на метиленовом молоке основана на следующих особенностях: при окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором водорода может быть кроме молекулярного кислорода ряд органических красителей, которые, присоединяя водород, восстанавливаются и обесцвечиваются. Такие свойства отмечены у лакмусовой настойки, метиленового синего, малахитового зеленого и т.д. Результат учитывают через сутки инкубирования посевов. В случае редукции красителя среда окрашена в кремовый цвет.

Тест-системы для быстрой идентификации бактерий по группе специально отобранных биохимических призна-

ков обычно представляют собой пластмассовые пластины с лунками, заполненными различными сухими средами (субстратами). В эти среды вносят суспензию исследуемой культуры и после инкубирования учитывают результат. К тест-системам прилагают таблицы для учета результатов и идентификации микроорганизмов в зависимости от спектра выявленных ферментов.

Определение гемолитических свойств микроорганизмов. Бактерии некоторых видов в процессе жизнедеятельности продуцируют особые вещества, обладающие лизирующим действием на эритроциты, - гематоксины (белковой природы), разрушающие оболочку эритроцитов. Для определения гемолитической способности бактериальные культуры высевают на питательные среды, содержащие 5-процентной дефибринированной крови (чаще кровяной МПА). При росте микроорганизмов, обладающих гемолитическими свойствами, вокруг колонии в результате лизиса эритроцитов образуется прозрачная зона (бесцветная или окрашенная). В жидких средах при гемолизе среда становится прозрачной (красная лаковая кровь).

Контрольные вопросы

1. Что понимают под культуральными свойствами микроорганизмов?
2. Как характеризуют рост культур микроорганизмов на плотных питательных средах?
3. Как характеризуют рост культур на жидких средах?
4. Что понимают под ферментативными свойствами микроорганизмов?
5. Какие питательные среды используют для изучения ферментативных свойств?
6. Как определяют протеолитические свойства?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 11 АНТИБИОТИКИ И БАКТЕРИОФАГИ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ, АКТИВНОСТИ ФАГА

Цель занятия: изучить методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и активности бактериофага.

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности бактерий (в том числе актиномицетов), грибов, растений (фитонциды) и животных, обладающие активностью по отношению к микроорганизмам определенных групп, способные задерживать их рост (бактериостатическое действие) или полностью подавлять их жизнедеятельность (бактерицидное действие). Антибиотики готовят промышленным путем в виде солей натрия, калия, кальция и выпускают в специальных упаковках. При выпуске антибиотика (промышленном или лабораторном) обязателен контроль его активности.

По происхождению различают антибиотики, продуцируемые грибами и лишайниками (пенициллин, гризеофульвин), актиномицетами (стрептомицин, неомицин, тетрациклин, эритромицин), бактериями (граммицидин, полимиксин, тиротрицин, субтилин), высшими растениями (алинин, фитоалексин, препарат алоэ, фитонциды лука, чеснока) и антибиотики животного происхождения (лизозим, эритрин, экмолин).

По спектру действия антибиотики делят на: действующие на одну группу микроорганизмов (грамположительные или грамотрицательные) или на разные группы микробов.

Биологическую активность антибиотиков выражают в единицах действия (ЕД), содержащихся в 1 мл раствора или в 1 мг препарата. За одну единицу принимают минимальное количество антибиотика, которое подавляет рост стандартного тест-микроба в строго определенном объеме питательной среды. При установлении активности каждого антибиотика используют определенный для того или иного препарата тест-микроб, обладающий самой высокой чувствительностью к данному антибиотику. Единица биологической активности у разных антибиотиков неодинакова: 1 ЕД пенициллина эквивалентна 0,6 мкг, стрептомицина – 1 мкг, неомицина – 3,3 мкг чистого вещества. Весовое количество антибиотика, эквивалентное его одной ЕД называют международной единицей.

К методам определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам относят метод диффузии в агар, метод серийных разведений (на жидкой и плотной питательных средах) и ускоренные методы.

Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков). Это наиболее простой в исполнении метод. В качестве питательной среды применяют МПА, агар на переваре Хоттингера с содержанием 120-140 мг процентаминого азота или агар фирмы «Диско». Диски с антибиотиками (диаметр 5-6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором. При переувлажнении он меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4-20 °С.

Расплавленную питательную среду разливают в чашки Петри по 20 мл (толщина слоя 4-5 мм). Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате. Для посева ис-

пользуют суточную бульонную культуру или смывы суточной агаровой культуры. 1 мл микробной суспензии в физиологическом растворе (концентрация клеток 10^9 мл) наносят на агар и покачиванием чашки распределяют по поверхности питательной среды. Избыток жидкости удаляют стерильной пастеровской пипеткой.

Засеянные чашки Петри подсушивают при комнатной температуре 30-40 минут, а затем на поверхности среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37°C в течение 18 часов в положении вверх дном.

Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя таким образом вокруг диска зону отсутствия роста (рис.11). Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура.

Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм – о достаточной чувствительности, свыше 25 мм – о высокой чувствительности.



Рисунок 11 – Различная чувствительность бактерий к антибиотикам

Чтобы получить более точные результаты исследования, необходимо соблюдать стандартные условия при постановке опыта. Для проверки точности и стандартности определения чувствительности к антибиотикам Всемирная организация здравоохранения рекомендует контролировать диски на эталонных штаммах микроорганизмов, которыми служат три культуры из Американской коллекции в Англии: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Метод серийных разведений. Для проведения опыта готовят основные растворы антибиотиков, используя стандарты антибиотиков. На этикетке ампулы со стандартом указана концентрация антибиотика в ЕД/мл или мкг/мл. Навески бензилпенициллина калиевой или натриевой соли, ампициллина тригидрата, оксациллина натриевой соли, цефалотина, цефалексина растворяют в 1/15М фосфатном буфере. Основные растворы тетрациклиновых антибиотиков готовят на 0,01 н. растворе соляной кислоты. Для приготовления основных растворов нео-, моно-, канамицина

используют дистиллированную воду. Концентрация основных растворов антибиотиков составляет 1000мкг/мл.

Метод серийных разведений на жидкой питательной среде. При определении чувствительности к антибиотикам для основной массы микроорганизмов используют МПБ или бульон на переваре Хоттингера. Для стрептококков в среду добавляют 1-процентный раствор глюкозы, для патогенных грибов используют среду Сабуро.

Агаровые или бульонные культуры микроорганизмов предварительно разводят физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ /мл.

Учет результатов. Наименьшее количество антибиотика, дающее визуально полную задержку роста (бульон прозрачный), соответствует минимальной подавляющей концентрации препарата. Минимальную бактерицидную концентрацию определяют высевом на плотные питательные среды из последних прозрачных пробирок, которые предварительно встряхивают. Наименьшее количество антибиотика в пробирке, содержимое которой после инкубирования в течение 24-72 часа не дало роста бактерий при высевае на питательную среду, принимают за минимальную бактерицидную концентрацию.

Метод серийных разведений на плотной питательной среде. Для определения чувствительности к антибиотикам большинства микроорганизмов используют МПА или агар на переваре Хоттингера с содержанием аминного азота 120-140 мг/мл, рН 7,2-7,4. Приготовленный основной раствор антибиотиков разводят в плотной питательной среде. Для этого к расплавленному и охлажденному до 55°C агару, разлитому в широкие пробирки по 18 мл, добавляют по 2 мл соответствующего разведения определенного антибиотика, тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки Петри подсушивают в течение 1 часа. Контрольные чашки

Петри с агаром не содержат антибиотика. Все чашки Петри делят на сектора, каждый из которых засевают исследуемой культурой. Посев делают бактериологической петлей из микробной суспензии с концентрацией клеток 10^6 - 10^7 /мл. Чашки помещают в термостат при 37°C на 20-24 часа.

Наименьшую концентрацию антибиотика, при которой наблюдают полную задержку роста бактерий на агаре или рост единичных колоний, принимают за минимальную подавляющую концентрацию препарата. В том случае, когда рост культуры отсутствует на всех чашках, кроме контрольной, считают, что исследуемые концентрации антибиотиков превышают минимальную подавляющую концентрацию препарата. Если на всех чашках отмечают рост культуры, это значит, что микроорганизм устойчив ко всем концентрациям антибиотика.

Бактериофаги представляют собой вирусы, адаптировавшиеся в процессе эволюции к паразитированию в прокариотических клетках. Репродукция многих бактериофагов в клетке приводит к лизису. На специфической адаптации фагов к строго определенным видам (штамма) бактерий и внешнем проявлении поражения бактериальных клеток (лизис) основано практическое использование бактериофагов. При помощи известного (диагностического) фага можно обнаружить и идентифицировать бактерии. Кроме того, биологическая промышленность выпускает лечебно-профилактические бактериофаги.

Методика обнаружения фага

1. В две пробирки с жидкой средой засевают гомологичную фагу бактериальной культуры. В одну из пробирок пастеровской пипеткой вносят каплю фага. Обе пробирки помещают в термостат. Через 16-18 часов в пробирке, где находился фаг, вследствие лизиса бактерий под его влия-

нием бульон просветляется. В другой пробирке (без фага) наблюдается обильный рост засеянной культуры.

2. Обе засеянные пробирки ставят в термостат, через 4 – 6 часов роста культуры при четко выраженном помутнении среды в одну из пробирок вносят каплю специфического фага и обе пробирки вновь ставят в термостат и учитывают результат через 16-18 часов (после первоначального посева). В пробирке с фагом среда просветляется, а без фага – она становится еще более мутной (обильный рост культуры).

3. Для выявления действия фага на плотной среде бульонную культуру высевают на агар в чашках Петри. Одну каплю культуры растирают стеклянным шпателем по всей поверхности агара. Крышку закрывают, чашки помещают в термостат на 3-4 часа. Затем в одну чашку на агаре с молодой культурой вносят фаг по одной капле в нескольких местах и вновь чашки ставят в термостат на сутки. По истечении этого времени в контрольной чашке (без фага) обычно наблюдается обильный сплошной рост бактерий по всей поверхности среды. В чашке с добавленным фагом наблюдается задержка роста бактерий в местах нахождения капель с фагом.

Определение литической активности бактериофага.
У диагностических и лечебно-профилактических фагов должна быть выражена литическая активность, которую определяют путем титрования фагов, например, в жидкой питательной среде.

В бактериологические пробирки разливают по 4,5 мл стерильного МПБ. В первую пробирку вносят 0,5 мл исследуемого фага, затем готовят его десятикратные разведения от 10^1 - 10^{10} . К разведениям бактериофага добавляют по капле суточной бульонной культуры чувствительного к данному фагу вида бактерий, инкубируют при 37°C 24 часа. За титр фага принимают его максимальное разведе-

ние, еще способное вызвать лизис бактерий – среда в пробирке прозрачна. Фаг считают активным при титре 10^7 - 10^8 .

Определение количества бактериофага (по методу Грациана). Готовят десятикратные разведения исследуемого фага в физиологическом растворе. Затем из последнего разведения берут 0,5 мл жидкости, смешивают с равным объемом чувствительной к данному бактериофагу бульонной культуры бактерий. Полученную смесь добавляют к 4 мл расплавленного 0,7-процентного МПА, перемешивают и выливают на поверхность подсушенного питательного агара в чашки Петри. Аналогично поступают со всеми разведениями бактериофага. Чашки инкубируют в термостате при 37°C 24 часа.

Учет результатов. Не пораженные бактериофагом бактерии растут и образуют сплошной газон на поверхности питательного агара. Клетки, пораженные фагом, лизируются, и в этой зоне можно видеть «стерильные» пятна на сплошном бактериальном газоне. Количество этих пятен («бляшек») соответствует количеству фаговых частиц в суспензии.

Применение фагов для идентификации бактерий. Фаги применяют для видовой идентификации бактерий (возбудитель сибирской язвы, листериоза) или внутривидовой – установление фаговара конкретного бактериального штамма.

Для идентификации неизвестной культуры бактерий при помощи диагностического бактериофага обычно используют плотную питательную среду. Например, исследуемую 18-часовую культуру, предположительно листерий, засевают в МПБ с глюкозой, инкубируют при 37°C 4 часа до легкой опалесценции среды и затем засевают газонном (0,1 мл) на подсушенный 2-процентный МПА в чашку Петри через 1-1,5 часа инкубирования посевов при 37°C

При слегка приоткрытой крышке на одну половину газона наносят каплю листериозного бактериофага 2А и на вторую половину помещают каплю фага 4А. Посевы инкубируют при 22-25°С 16-24 часа.

Учет результатов. Если культура листериозная, то на месте нанесения хотя бы одного фага можно видеть прозрачную зону лизиса. Для установления фаговара исследуемую культуру проверяют с набором типовых фагов, охватывающих все фаговарианты данного вида бактерий, определяют, к какому фагу чувствителен данный штамм, что и служит его маркером.

Контрольные вопросы

1. Что такое антибиотики?
2. Как определяют активность антибиотиков?
3. Как классифицируют антибиотики?
4. Что такое бактериофаг?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 12 ПРАВИЛА ЗАРАЖЕНИЯ И ВСКРЫТИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятия: Изучить технику заражения лабораторных животных, правила их бактериологического исследования. Освоить методы определения вирулентности микроорганизмов и тестирования факторов патогенности бактерий.

Экспериментальное заражение лабораторных животных (биопроба). Этот метод применяют для выделения из исследуемого материала возбудителя болезни, испытания патогенности изучаемого микроорганизма, определения эффективности вакцин, иммунных сывороток и т.д.

О патогенности микроорганизма судят по его способности вызывать заболевание или гибель зараженного животного, а также по отдельным факторам патогенности (косвенные признаки).

Для заражения используют лабораторных животных разных видов (мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов, голубей и др). Выбор животного зависит от его чувствительности к исследуемому виду микроорганизма. В отдельных случаях заражают естественно-восприимчивых животных (свиней, крупный рогатый скот, овец и т.д.). Если изучают выделенную культуру микроорганизма, то для заражения берут 18-24 часовую агаровую или бульонную культуру. При заражении животных исследуемым материалом (ткани органов, гной, слизь, кровь и т.д.) последний предварительно растирают в ступке со стерильным физиологическим раствором. Для опыта берут животных, одинаковых по массе и возрасту.

Помещение для содержания лабораторных животных (виварий) должно иметь несколько отделений: карантинное, клиническое для выполнения определенных работ (взятие крови, заражение, вскрытие и т.д.), кладовую, кухню и прочее. Перед заражением животных метят: кроликов и морских свинок – металлическими ушными номерами; мышей и крыс – раствором краски (фуксин, метиленовый синий и т.д.). Для удобства и безопасности работы животных фиксируют.

Морских свинок помощник держит брюшком вверх так, чтобы средний палец левой руки находился на шее, а большой и указательный – у передних конечностей животного. Правой рукой придерживают задние конечности. Мышь берут одной рукой за кончик хвоста, другой – за кожную складку затылка и поворачивают в нужное положение. Крыс фиксируют корцангами. Захватив складку кожи затылка, плотно прижимают голову к поверхности

стола. Другой рукой держат за хвост и поворачивают в нужном положении, оттягивают корцангом голову.

Методы заражения животных. При заражении используют только стерильные инструменты – шприцы, иглы, ланцеты, пинцеты и т.д.

Скарификация (накожное заражение) – на месте заражения предварительно выстригают шерсть и дезинфицируют кожу. Затем скальпелем делают небольшие надрезы кожи (насечки) и в них втирают жесткой щеточкой исследуемый материал или бактериальную культуру.

Внутрикожное заражение – пальцами левой руки оттягивают кожу и в образовавшуюся между ними кожную складку вводят кончик иглы. Объем вводимого материала не должен превышать 0,2 мл. Показатель правильного введения – припухлость размером с горошину.

Подкожное заражение – пальцами левой руки оттягивают кожу, и в образовавшийся «кармашек» - складку вводят иглу шприца, затем его содержимое. Место заражения у кроликов – со стороны спины, несколько сбоку, у белых мышей и крыс – со спины к основанию хвоста. Объем вводимого материала не должен превышать для мышей 1 мл, для крыс, морских свинок – 10 мл, кроликов – 20-25 мл.

Внутримышечное заражение – материал чаще вводят с внутренней поверхности бедра. Голубей и кур заражают также и в грудную мышцу. Объем вводимого материала мышам 0,5 мл, морским свинкам и крысам по 3-5 мл, кроликам 5-8 мл, большие дозы следует вводить дробно в 2-3 места.

Внутрибрюшинное (интраперитонеальное) заражение - животное фиксируют головой вниз, иглу шприца вводят в нижнюю треть живота, чуть отступая от белой линии. Доза не должна превышать 0,1-0,2 мл.

Внутривенное заражение – исследуемый материал вводят кроликам в краевую вену уха, мышам и крысам – в

вену хвоста. Перед заражением место инъекции протирают тампоном, смоченным ксилолом или теплой водой, чтобы вызвать наполнение сосудов кровью.

Интрацеребральное заражение – животных фиксируют в положении на спине. У кроликов трепанируют череп на участке между надбровным углом и черепным гребнем. Выстригают шерсть и дезинфицируют кожу. Пальцами левой руки растягивают ее над глазницей параллельно черепному гребню и рассекают (края раздвигают). Крестообразно разрезают надкостницу. Аленьким трепаном осторожно прокалывают черепную кость. Осторожным поворотом выпиливают диск, и этот небольшой кусочек кости извлекают. Шприцем вводят 0,2 мл исследуемого материала. После этого осторожно соединяют края надкостницы, кожную рану закрывают тампоном и заливают коллодием. У мышей и крыс трепанацию не делают, а легким проколом костной ткани черепа вводят кончик тонкой иглы и инъецируют материал.

Интраназальное заражение – животное предварительно слегка наркотизируют, прикладывая к носу вату, смоченную эфиром, затем с помощью глазной пипетки вводят материал.

Оральное заражение – исследуемый материал добавляют в корм, воду или вводят через небольшой зонд.

Кроме того, животных заражают в переднюю камеру глаза (интраокулярно). Производится обычно у кроликов под местной анестезией глаза. Затем фиксируют глазное яблоко путем захватывания складки конъюнктивы (к наружи от верхнего края роговицы) глазным пинцетом. После этого тонкой иглой, смоченной исследуемым материалом, протыкают роговицу у лимба в очень косом направлении и проникают в переднюю камеру глаза на глубину не менее 1 мм. Иглу тотчас же вынимают, а ранка закрывается сама по себе. При правильном введении иглы

вытекания влаги из передней камеры быть не должно. Можно также после прокола роговицы продвинуть иглу в центральном направлении до тех пор, пока из просвета иглы не покажется жидкость. Выпустив несколько капель влаги передней камеры глаза, иглу соединяют со шприцем и вводят исследуемый материал (не более 0,05 мл).

Бактериологическое исследование трупа животного. Проводят с целью выделения чистой культуры микроба при диагностических исследованиях либо для подтверждения специфической природы гибели животного при заражении чистой культурой микроорганизма.

Трупы животных вскрывают, соблюдая правила асептики. Тело животного фиксируют в положении на спине на доске или в кювете с парафином. Кожно-шерстный покров дезинфицируют 5-процентным раствором фенола или лизола. Разрезают кожу по белой линии от промежности до грудинно-ключичного сочленения. Затем кожу отделяют от мышц, делают поперечные надрезы и кожные лоскуты отводят в сторону. Пинцетом захватывают мечевидный отросток, под ним надрезают мышцы, ножницами с обеих сторон рассекают ребра, грудину откидывают кверху.

Сначала вскрывают грудную полость. Учитывая патологоанатомическую картину, записывают в журнале экспертизы. Поверхность сердца, легких, лимфатических узлов прижигают раскаленным шпателем. Пастеровской пипеткой прокалывают в этом месте орган, насыщают небольшое количество крови (тканевой пульпы) и высасывают ее на питательные среды, соблюдая стерильность.

Затем вскрывают брюшную полость. Пинцетом оттягивают вверх брюшную стенку и ножницами разрезают ее от диафрагмы до анального отверстия (важно не повредить кишечник!). Осматривают органы брюшной полости, отмечая разрезы, цвет и консистенцию паренхиматозных ор-

ганов, состояние кишечника, наличие экссудата в брюшной полости и его характер. Также после прижигания поверхности делают посевы из печени, почек, селезенки, лимфатических узлов, в случае необходимости из содержимого кишечника и других органов.

Параллельно из тканей органов готовят мазки-отпечатки для микроскопического исследования. Для этого стерильными ножницами отрезают кусочек органа и к поверхности разреза несколько раз отдельными участками прикладывают предметное стекло. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают, микроскопируют.

По аналогичной схеме исследуют трупы и других экспериментально зараженных животных, а также отдельные органы и ткани сельскохозяйственных животных (патологический материал), поступающие в лабораторию для исследования. При работе с трупами соблюдают меры, предупреждающие распространение возбудителя инфекции. После окончания исследования кюветы, доски, рабочий стол дезинфицируют. Инструменты стерилизуют. Трупы животных и отдельные органы обеззараживают автоклавированием или сжигают в трупосжигательной печи.

Для определения вирулентности и токсигенности микроорганизмов в повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности микроорганизма. При оценке биопрепаратов необходимы количественные характеристики вирулентности микроорганизма, взятого для заражения животного.

Вирулентность (токсигенность) микроба измеряют в специальных условных единицах: абсолютная летальная доза (D_{cl} - *dosis certae letalis*) вызывает гибель 100% зараженных животных; 50% летальная доза (LD_{50}) – 50% зараженных животных; 50% инфицирующая доза (ID_{50}) вызывает заболевание 50% зараженных животных. LD_{50} и ID_{50} - наиболее точные показатели, поскольку чувствительность

к возбудителю (токсину) большинства взятых в опыт животных, а D_{c1} показывает чувствительность наиболее устойчивых особей.

Контрольные вопросы

1. Как проводят заражение лабораторных животных?
2. С какой целью заражают лабораторных животных?
3. Опишите методику вскрытия лабораторных животных

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 13 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ, ПОЧВЫ, ВОЗДУХА

Цель занятия: изучить основные методы и показатели, необходимые для санитарно-микробиологической оценки объектов внешней среды.

Для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов окружающей среды проводят санитарно-бактериологические исследования, цель которых состоит в определении эпизоотологической и эпидемиологической безопасности. Показателем неблагополучия служит выявление патогенных микроорганизмов. Однако прямое их обнаружение связано с большими трудностями, и прежде всего с низкой концентрацией данных микробов, которые в основном не могут размножаться в воде, воздухе и почве.

Поэтому в санитарно-микробиологической практике используют косвенные методы, направленные на определение микробной обсемененности объекта и обнаружение в нем так называемых санитарно-показательных бактерий. О бактериальной обсемененности судят по микробному числу – общему количеству микроорганизмов, содержа-

щихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).

Санитарно-показательных бактерий определяют по двум показателям: титру и индексу. Титром называют минимальный объем или массу, в которых выявляют данные бактерии, индексом – количество санитарно-показательных бактерий, содержащихся в соответствующем количестве среды.

К санитарно-показательным бактериям относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, для которых среда обитания – кишечник или воздушно-дыхательные пути. Они характеризуются следующими свойствами:

- 1) постоянно выделяются с калом или капельками слизи из воздушно-дыхательных путей;
- 2) не имеют других мест обитания;
- 3) способны сохраняться в окружающей среде в то же время, что и патогенные бактерии, паразитирующие в кишечнике или воздушно-дыхательных путях;
- 4) не способны интенсивно размножаться вне организма хозяина и изменять свои свойства.

Перечисленные признаки присущи бактериям, признанным санитарно-показательными для различных объектов окружающей среды.

Санитарно-показательные бактерии группы кишечных палочек принадлежат к различным родам семейства энтеробактерий.

Обнаружение кишечной палочки в разных объектах окружающей среды считают наиболее достоверным признаком свежего фекального загрязнения. Наличие в этих же объектах бактерий родов *Citrobacter* и *Enterobacter* указывает на относительно давнее фекальное загрязнение.

Присутствие *S.perfringens*, *S.sporogenes* и других клостридий в почве свидетельствует о ее фекальном за-

грязнении, причем как свежем, так и давнем, поскольку эти бактерии образуют споры, что позволяет им длительно переживать в окружающей среде (в частности, в почве).

Обнаружение в объектах окружающей среды *Streptococcus faecalis* также свидетельствует об их фекальном загрязнении. Резкое увеличение количества этих бактерий в саморазогревающемся навозе и компостах может свидетельствовать о загрязнении почвы разлагающимися отбросами.

Гемолитические стрептококки выделяются с капельками слизи орально-капельным путем. Сроки выживания их в окружающей среде практически не отличаются от сроков, характерных для большинства других возбудителей воздушно-капельных инфекций. Обнаружение гемолитических стрептококков в воздухе помещений указывает на возможное его загрязнение микроорганизмами, содержащимися в зеве, носоглотке, верхних дыхательных путях и вызывающими инфекции, передаваемые воздушно-капельным путем.

Streptococcus aureus – также факультативный обитатель носоглотки и зева. Его присутствие в воздухе помещений служит показателем орально-капельного загрязнения.

Одновременное обнаружение золотистого стафилококка и гемолитических стрептококков свидетельствует о высокой степени загрязнения воздуха.

Санитарно-микробиологическое исследование воды. Вода – естественная среда обитания микробов, которые в большом количестве поступают из почвы, воздуха, с отбросами, стоками. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках. Кроме сапрофитов в воде могут находиться возбудители инфекции животных и человека.

При контроле санитарного состояния воды исследованию подлежат: вода централизованного водоснабжения,

колодцев, открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, сточной жидкости.

Отбор проб воды. Из открытых водоемов пробы воды отбирают с глубины 10-15 см от поверхности и на расстоянии 10-15 см от дна. Водопроводную воду набирают в стерильные флаконы объемом 0,5 мл с притертой пробкой. Предварительно кран обжигают и спускают воду в течение 10-15 минут. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализуют тиосульфатом натрия из расчета 10 мл на 1 л воды. Бактериологическое исследование проб воды следует проводить в течение двух часов после отбора или шести часов при температуре хранения 1-5°C.

Определение микробного числа воды. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, воду открытых водоемов – по 1,0; 0,1; 0,01 мл. Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-12 мл расплавленного и охлажденного до 40-45°C питательного агар, который тщательно перемешивают с водой. Посевы инкубируют при 37°C в течение 1-2 суток. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37°C в течение суток, другую – 2 суток при 20°C. Затем подсчитывают количество колоний, выросших на поверхности и в глубине колоний и вычисляют микробное число воды – количество микроорганизмов в 1 мл.

Определение коли-титра и коли-индекса воды. Минимальное количество воды в мл, в котором обнаруживают бактерии группы кишечных палочек (БГКП), называют коли-титром воды. Количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды, называют коли-индексом воды. Коли-титр и коли-индекс воды определяют титрационным (бродильным) методом или методом мембранных фильтров.

Титрационный метод. В глюкозно-пептонную среду проводят посевы различных объемов воды.

Воду открытых водоемов исследуют в объемах 100; 10; 1 и 0,1 мл. Для анализа водопроводной воды делают посеvy трех объемов по 100 мл, трех объемов по 10 мл и трех объемов по 1 мл. Посевы инкубируют при 37°C в течение суток. О брожении судят по образованию пузырьков газа в поплавке.

Из забродивших или помутневших проб делают посеvy на среду Эндо. Из выросших колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, с помощью которого дифференцируют бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. С этой целью 2-3 изолированные колонии наносят «штрихом» на фильтровальную бумагу, смоченную диметил-п- фенилендиамидом.

При отрицательном оксидажном тесте цвет бумаги не изменяется, при положительном она окрашивается в синий цвет в течение 1 минуты. Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном тесте – вносят в полужидкий питательный агар с 0,5-процентной глюкозы и инкубируют 37°C в течение суток.

Метод мембранных фильтров. Определенный объем воды пропускают под давлением через мембранный фильтр №3, предварительно стерилизованный кипячением в дистиллированной воде. Водопроводную воду и воду артезианских скважин фильтруют в объеме 333 мл. Чистую воду открытых водоемов фильтруют в объеме 100, 10, 1 и 0,1 мл, более загрязненную воду перед фильтрованием разводят стерильной водой.

Фильтры накладывают на агар Эндо в чашки Петри и после инкубации при 37 °С в течение суток подсчитывают количество выросших красных колоний. Из двух-трех колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и ставят оксидазный тест. Грамотрицательный палочки, не образуют

оксидазу, принадлежат к БГКП. По существующим нормативам (ГОСТ 2874-82) питьевую воду считают качественной если ее коли-индекс не более 3, а микробное число – не более 100.

Общепринятым дополнительным показателем фекального загрязнения воды служит количество *S.faecalis*. Для определения его титра цельную воду и ее 10-кратные разведения засевают в жидкую элективную среду (щелочная полимиксиновая среда). После инкубирования при 37 °С в течение двух суток, а затем еще через сутки и двое суток делают высевы на плотные элективные среды. Фекальные стрептококки идентифицируют по морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха. Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды. Воздух – неблагоприятная среда для обитания микроорганизмов из-за отсутствия питательных веществ, действия солнечных лучей, высушивания. Наряду с сапрофитами в воздухе могут находиться патогенные бактерии, споры грибов родов *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям:

- 1) определение микробного числа воздуха;
- 2) определение количества санитарно-показательных бактерий – гемолитических стрептококков и стафилококков.

Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения (седиментации), аспирации или фильтрации.

Седиментационный метод осаждения Коха. Чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5-10 минут. Для определения санитарно-показательных бактерий берут чашки Петри с кровяным МПА и время экспозиции увеличивают до 40 минут. Чашки выдерживают при 37 °С и

комнатной температуре 24 часа и подсчитывают выросшие колонии.

Микробное число воздуха (общее количество бактерий в 1 м³) определяют по формуле Омелянского:

$$X = \frac{a * 100 * 1000 * 5}{b * 10 * T} \quad (1)$$

где X – количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха;

a – количество выросших колоний в чашках;

b – площадь;

T – время, в течение которого чашка была открыта;

5 – время по правилу Омелянского;

10 – объем воздуха в литрах. (правило Омелянского предусматривает, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см² за 5 минут из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в его 10 л).

Прямое обнаружение патогенных микробов воздуха проводят только при специальных показаниях.

Аспирационный метод. Более точный количественный способ определения микробного числа воздуха, так как посев микроорганизмов из воздуха производят с помощью приборов. При использовании аппарата Кротова воздух с заданной скоростью засасывается через щель плексигласовой пластины и ударяется о поверхность питательной среды открытой чашки Петри, находящейся на вращающейся подставке, благодаря чему происходит равномерный посев бактерий из воздуха на поверхность МПА или кровяного МПА.

После инкубации в термостате в течение двух суток подсчитывают количество выросших колоний и определяют микробное число воздуха. При исследовании воздуха

могут быть использованы и другие приборы (Дьякова, Киктенко, ПАБ-1).

$$X = \frac{a \cdot 1000}{V}, \quad (2)$$

где X – микробное число;

a – количество колоний, выросших в чашке Петри;

V – объем пропущенного через прибор воздуха, дм³;

1000 – искомый объем воздуха, дм³.

В практику вошли ускоренные методы индикации микрофлоры воздуха с помощью мембранных фильтров, каскадных импакторов, фильтров Петрякова и др.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

Анализ почвы включает в себя определение микробного числа, коли-титра, перфинген-титра и титра термофильных бактерий. По эпидемиологическим и эпизоотологическим признакам проводят определение в почве патогенных микроорганизмов: сальмонелл, шигелл, возбудителей столбняка, ботулизма, злокачественного отека, сибирской язвы. Бактериологический анализ почвы нужен при выборе территории под пастбище, ферму, хозяйственные постройки, детские сады, больницы и т.д.

Предварительно делают отбор проб почвы. На обследуемой территории площадью 1000 м² выделяют два участка по 25 м² (один – вблизи источника загрязнения, другой – в отдалении от него), берут пробы из 5 точек (4 – по углам, 1 – в центре) на глубине 10-20 см стерильным совком (из более глубоких мест – с помощью специального бура Некрасова или Френкеля). Пробы почвы по 200-300 г отбирают в широкогорлые стеклянные банки с ватными пробками (можно все взятые с одного участка пробы пере-

мешать и на исследование отправить 1 кг). На банки наклеивают этикетки, отправляют с нарочным и сопроводительным письмом. Пробы почвы полагаются исследовать сразу же или в течение 6-18 часов, сохраняя их при температуре не выше 1-5°C.

В лаборатории почву измельчают, освобождают от камней, осколков стекол, корней растений, просеивают через сито, тщательно перемешивают и отвешивают 30 г. В колбу на 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят в нее отвешенную пробу почвы. Все интенсивно встряхивают 10 минут, не давая отстояться частицами суспензии. Затем готовят серию десятикратных последовательных разведений.

Для относительно чистых почв достаточно 4 степени разведения, для загрязненных – 6-9 разведений. В штатив ставят нумерованные пробирки с 9 мл стерильной воды в каждой. В первую вносят 1 мл суспензии пробы почвы, смешивают. Затем 1 мл из первой пробирки вносят во вторую, смешивают, из нее - 1 мл в третью и т.д. В результате в пробирке № 1 получается разведение 1:100, в пробирке № 2 – 1:1000 и т.д. Подготовленные таким образом пробы почвы исследуют.

Определение общего микробного числа. Из последних 3-4 пробирок с разведенной суспензией отдельными стерильными пипетками вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри (каждое разведение в отдельности). В каждую чашку добавляют еще по 10-15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА.

Равномерными осторожными круговыми движениями содержимое чашек перемешивают, оставляют на столе для уплотнения (затвердения) агара. С застывшей средой чашки перевертывают вверх дном, надписывают и помещают в термостат для культивирования на 24-48 часов при 37°C. Выросшие колонии подсчитывают в каждой чашке,

умножают на степень разведения. Полученные числа суммируют и вычисляют среднеарифметическое число, что составит количество микробов, содержащихся в 1 г почвы.

Определение коли-титра, перфрингенс-титра и титра термофильных бактерий почвы. Для определения коли-титра почвы различные разведения почвенной взвеси засевают по 1 мл в пробирки со средой Кесслера и инкубируют при 43 °С в течение 48 часов. В дальнейшем исследования проводят по схеме, применяемой при определении коли-титра воды.

Наибольшее разведение почвенной суспензии, в котором отмечена ферментация лактозы (газообразования), соответствует коли-титру почвы. Для определения перфрингенс-титра почвы, различные разведения почвенной суспензии по 1 мл засевают в пробирки со стерильным обезжиренным молоком или железосульфитной средой Вильсон-Блера, приготовленной *ex tempore*. Посевы инкубируют при 43°С в течение 48 часов, после чего учитывают результаты по свертыванию молока или по образованию черных колоний *S.perfringes* в агаровом столбике среды Вильсон-Блера. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр, который соответствует наибольшему разведению почвы, вызвавшему почернение и разрыв среды Вильсон-Блера в первые 12 часов роста.

Для определения титра термофильных бактерий разведения почвенной суспензии по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным агаром. Посевы инкубируют в течение суток при 60°С, а затем подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 почвы.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по комплексу показателей, из которых наиболее важный – установление степени фекального загрязнения.

Контрольные вопросы

1. Какие правила предъявляют к отбору проб воды, почвы, воздуха?
2. На какие санитарно-микробиологические показатели исследуют почву, воду, воздух?
3. Опишите методы исследования воздуха.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 14 МИКРОФЛОРА МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Цели занятия: ознакомиться с санитарно-бактериологическим исследованием молока, определением ОМЧ и показателей сорта молока, а также микрофлорой молочнокислых продуктов.

Бактериологическое исследование молока

Сорт молока зависит от общего микробного числа (ОМЧ) в 1 мл. По санитарным правилам и нормам (СанПиН) 2.3.2.1078-01 установлены нормативы для сырого молока: молоко сырое, высший сорт – не более 300 000 бактерий в 1 мл; молоко сырое, первый сорт – не более 500 000 бактерий в 1 мл; молоко сырое, второй сорт – не более 4 000 000 в 1 мл.

Количество бактерий в 1 мл сырого молока определяют по методике: 1 мл сырого молока вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды – получается первое разведение 1:10 (10^1), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды – получается разведение 1:100 (10^2) и так далее до разведения – 1: 10^6 , т.е. до миллиона. Из двух

последних разведений (10^5 и 10^6) по 1 мл вносят в две чашки Петри. Каждую заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА, перемешивают легким вращательным покачиванием и после застывания агара помещают в термостат при 37°C на 24–48 часов.

Затем подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметическое число. Для подсчета берут те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 300.

Число колоний, выросших в каждой чашке, пересчитывают на 1 мл или 1 г продукта с учетом разведения и определяют количество бактерий в 1 мл исследуемого молока. В условиях производства сорт молока определяют быстро косвенным путем. Для этого при его приеме учитывают комплекс признаков: кислотность, редуктазную пробу и степень чистоты по эталону.

На все показатели, по которым проводят контроль качества принимаемого молока, следует обращать самое серьезное внимание, так как его оценку при сдаче осуществляют по худшему из них. Так, если по редуктазной пробе молоко относится к первому классу, по степени чистоты к первой группе, а кислотность повышена, например, до 20°T , оно будет отнесено ко второму сорту.

Кислотность молока служит одним из основных показателей его санитарного качества. При приеме по нему осуществляют сортировку. Прямо связана эта кислотность с бактериальной обсемененностью. У свежего молока нейтральная реакция, оно почти не содержит в своем составе молочную кислоту.

Обозначают кислотность молока в условных градусах Тернера ($^\circ\text{T}$). Под условными градусами понимают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия (калия) едкого, необходимое для нейтрализации 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой при индикато-

ре фенолфталеине. Показатель титруемой кислотности позволяет установить повышение кислотности в результате размножения молочнокислых бактерий, сбраживающих лактозу до молочной кислоты. Чем дольше хранится молоко в неохлажденном состоянии, при температуре выше $+10^{\circ}\text{C}$, тем больше в нем накапливается молочной кислоты и тем выше его кислотность.

Нормальная кислотность свежего молока колеблется от 16 до 18°T . Выше 21°T начинается первая степень порчи молока – прокисание. Такое молоко не выдерживает тепловой обработки и не может быть сырьем для выработки стандартных молочных продуктов.

Определение степени чистоты

Показателем санитарных условий получения молока является степень его чистоты, которая характеризует наличие или отсутствие посторонних механических примесей.

Методика. Через специальный плотный ватный фильтр пропускают 150 мл молока и сравнивают полученный осадок на фильтре с эталоном. По степени загрязненности молоко делят на группы, при этом на фильтре: 1-я – нет частиц механической примеси; 2-я – отдельные частицы механической примеси; 3-я – заметный осадок (волоски, частицы сена, песка).

Проба на редуктазу

Данная проба является косвенным методом определения общей микробной обсемененности молока. Преимущество этого метода – простота и быстрота проведения анализа по сравнению с бактериологическим исследованием.

Сущность метода. Микроорганизмы, попавшие в молоко, в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду, наряду с другими окислительно-

восстановительными ферментами, анаэробные дегидразы, по старой классификации их называют редуктазами. Существует зависимость между общим количеством бактерий в молоке и содержанием в нем редуктазы. Это позволяет использовать редуктазную пробу как косвенный показатель бактериальной обсемененности сырого молока.

Фермент редуктаза обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, которая при этом обесцвечивается. Следовательно, чем больше редуктазы, тем больше бактерий в исследуемом молоке.

Методика. В пробирки наливают 20 мл исследуемого молока и 1 мл рабочего раствора метиленовой сини, закрывают резиновой пробкой, смешивают, трехкратно переворачивая пробирки (молоко при этом окрашивается в синий цвет). Пробирки помещают в водяную баню при 38–40°C. Наблюдение за изменением окраски ведут через 20 минут, 2 часа и 5 часов 30 минут после начала анализа.

В чистом свежем молоке фермента редуктазы очень мало, поэтому оно обесцвечивается долго. В зависимости от времени обесцвечивания метиленовой сини молоко относят к одному из четырех классов (табл. 1).

Таблица 1 – Классификация молока

Класс	Оценка качества молока	Продолжительность обесцвечивания	Количество бактерий в 1 мл молока
1-й	хорошее	свыше 5 ч 30 мин	менее 500 тыс.
2-й	удовлетворительное	свыше 2 ч до 5 ч 30 мин	от 500 тыс. до 4 млн.
3-й	плохое	свыше 20 мин до 2 ч	от 4 млн. до 20 млн.
4-й	очень плохое	20 мин и менее	20 млн. и выше

Определение ингибирующих веществ в молоке

Молочные предприятия не принимают молоко с нейтрализующими, консервирующими веществами, содержащими антибиотики и другие ингибирующие вещества. Эти вещества задерживают или подавляют (ингибируют) развитие молочнокислых микроорганизмов, применяемых для выработки кисломолочных продуктов. Для определения в молоке формалина, перекиси водорода, антибиотиков предложена резазуриновая проба.

Сущность метода заключается в том, что микроорганизмы, чувствительные к ингибирующим веществам, размножаясь, выделяют вещества, восстанавливающие резазурин.

К 10 мл молока добавляют 1 мл рабочего раствора резазурина и 3–4 капли термофильного стрептококка, чувствительного к антибиотикам. Содержимое пробирок перемешивают, молоко окрашивается в фиолетовый цвет. Пробирки ставят на водяную баню при 40°C и через 45 минут учитывают изменение цвета молока.

Заключение о качестве молока делают по изменениям:

- сине-стальной или фиолетовый цвет исследуемого молока в пробирке указывает на наличие антибиотиков (ингибирующих веществ); наблюдается ингибирование размножения молочнокислого стрептококка, поэтому молочная кислота не выделяется и цвет индикатора не изменяется;

- окрашивание содержимого пробирки в белый или розовый цвет указывает на то, что в молоке нет антибиотиков; молочнокислый стрептококк беспрепятственно размножается, поэтому образовавшаяся молочная кислота обесцвечивает резазурин.

Определение эффективности пастеризации

В торговую сеть молоко поступает в пастеризованном виде. Цель пастеризации – уничтожение гнилостных и молочнокислых бактерий для продления срока хранения молока. Режимы пастеризации, принятые в молочной промышленности, обеспечивают полное уничтожение возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, условно патогенных микроорганизмов и кишечной палочки.

На производстве применяют несколько режимов пастеризации молока: кратковременный – 74–76°C в течение 20 секунд; моментальный – 85–90°C без выдержки. После пастеризации молоко необходимо охладить до +4°C, что препятствует прорастанию спор и развитию оставшейся термофильной микрофлоры.

Микробиологический контроль эффективности пастеризации молока проводят в соответствии с действующей инструкцией, определяя:

- 1) общее микробное число в 1 мл (ОМЧ);
- 2) коли-титр и бродильный титр.

Для определения эффективности пастеризации проводят два анализа: посев сырого молока и посев молока после пастеризации. Эффективность пастеризации считается достигнутой, если объем остаточной микрофлоры не превышает 0,01% от первоначальной. Общее микробное число (ОМЧ) устанавливают в 1 мл исследуемого молока или молочных продуктов.

Для этого готовят последовательные разведения сырого молока до 10^6 , а пастеризованного молока – до 10^3 в стерильной воде. По 1 мл из двух последних разведений вносят в стерильные чашки Петри и заливают расплавленным и охлажденным до 45°C питательным агаром. Содержимое чашек тщательно перемешивают покачиванием и

после застывания среды их помещают в термостат при 37°C на 48 часов.

Затем подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметическое значение. Для подсчета берут те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 300. Общее микробное число в 1 мл молока вычисляют умножением количества колоний в чашке на степень разведения.

В соответствии с действующим стандартом питьевое (пастеризованное) молоко должно отвечать требованиям (СанПиН 23.2.1078-01). В кисломолочных продуктах ОМЧ не определяют из-за наличия специфической флоры, используемой для их изготовления, но обязательно контролируют состав молочнокислой микрофлоры при помощи микроскопии. Для характеристики санитарно-гигиенических условий производства и реализации молока устанавливают степень обсеменения бактериями группы кишечной палочки, то есть определяют коли-титр.

Коли-титр означает наименьшее количество взятого продукта, выраженное в мл (г), в котором обнаружены БГКП. Титр кишечной палочки в молоке и его производных определяют трехэтапным бродильным методом. При этом учитывают цитратотрицательные разновидности кишечных палочек.

Первый этап. Постановка первой бродильной пробы заключается в посеве продукта на среду Кесслера. Для этого в три пробирки со средой Кесслера вносят по 1 мл, а в три оставшиеся – по 0,1 мл молока.

Посевы ставят в термостат при 43°C на 24 часа (при такой температуре растет кишечная палочка, выделенная только от теплокровных). Пробирки с посевами просматривают, отмечают изменения: появление помутнения среды и газа в поплавках. По сумме признаков устанавливают бродильный титр.

Второй этап. Из каждой пробирки с забродившей пробой проводят посев на среду Эндо с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Для этого петлей берут минимальное количество посевного материала и проводят посев частым штрихом. Перед посевом дно чашки с агаром Эндо делят на четыре сектора. Чашки с посевами помещают в термостат при 37°C на 24 часа.

Третий этап. При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП (красных, розовых), продукт считают незагрязненным *E. coli*. При наличии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП, а также бесцветных, их изучают: готовят препарат из изолированных колоний, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Если в препарате обнаружены грамотрицательные палочки, ставят вторую бродильную пробу. Проверенные из каждого сектора колонии отсевают на цитратную среду Козера и глюкозо-пептонную (ГПС). Посевы в среде Козера помещают в термостат при 37°C, а ГПС при 43°C – на 24 часа. Учет результатов пересева колоний с агара Эндо на среду Козера состоит в отсутствии роста на цитратной среде Козера и указывает на присутствие в исследуемом продукте цитратотрицательных разновидностей БГКП (их учитывают). Изменение зеленого цвета среды на васильковый свидетельствует, что обнаруженные БГКП относятся к цитратположительным разновидностям (их не учитывают).

Учет результатов пересева колоний с агара Эндо на глюкозопептонную среду. Если в ГПС при 43°C нет брожения, считают, что в продукте БГКП отсутствуют. Если в ГПС произошло брожение и одновременно отсутствует рост на среде Козера, считают, что в продукте обнаружены БГКП. После учета результатов на ГПС и среде Козера вычисляют коли-титр исследуемого молока и молочных продуктов:

а) если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаружена кишечная палочка, считают коли-титр более 3,0 мл;

б) если в одном из засеянных объемов по 1 мл продукта обнаружена кишечная палочка, считают коли-титр, равный 3,0 мл;

в) если кишечная палочка обнаружена в пяти посевах или во всех объемах продукта, считают коли-титр менее 0,3 мл;

г) во всех остальных случаях считают коли-титр, равный 0,3 мл.

По результатам бактериологического исследования качества готовой продукции судят о санитарно-гигиеническом благополучии предприятия.

Кисломолочные продукты исследуют по такой же схеме, но перед посевом нейтрализуют. Для этого стерильной пипеткой вносят 10 мл исследуемого продукта в пробирку и добавляют 1 мл 10-процентного раствора питьевой соды.

Контрольные вопросы

1. На какие санитарно-микробиологические показатели исследуют молоко?
2. Как проводят отбор проб молока и молочных продуктов для микробиологических исследований?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 15 МИКРОФЛОРА КОРМОВ, МЯСА, ЯИЦ

Цель занятия: ознакомиться с микроскопическими и бактериологическими методами исследования мяса, кормов и яиц.

Для микроскопического исследования мяса из его проб на предметном стекле делают два мазка-отпечатка: один из поверхностного слоя, другой – из глубинных слоев.

Для приготовления препарата-отпечатка из поверхностных слоев мяса стерильными ножницами вырезают кусочек весом 1,0–1,5 г и прикладывают несколько раз срезанной стороной к предметному стеклу. Для приготовления препарата-отпечатка из глубинных слоев поверхность мяса прижигают скальпелем и делают разрез в глубину. Из глубины вырезают небольшой кусочек мяса, его прикладывают к предметному стеклу.

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и окрашивают по Граму. Исследуют 10 полей зрения и подсчитывают отдельно кокковые и палочковидные бактерии; после проводят оценку свежести мяса (табл. 2).

Препарат-отпечаток из свежего мяса окрашивается плохо. При микроскопии видны единичные кокки и палочки. В препаратах из глубинных слоев бактерии должны отсутствовать. Препарат-отпечаток из мяса подозрительной свежести окрашивается удовлетворительно. При микроскопии препарата из поверхностного слоя в поле зрения обнаруживают 20–30 кокков, единичные палочки, в препаратах из глубинных слоев – до 20 кокков и палочек. На стекле ясно заметны распавшиеся ткани мяса.

Таблица 2 – Оценка свежести мяса
микроскопическим методом

Степень свежести мяса	рН мяса	Микроскопические показатели
Свежее	5,9 – 6,5	Единичные кокки или палочки, на стекле остатков ткани нет
Подозрительной свежести	6,6	До 20-30 кокков, единичные палочки. На стекле следы распада мышечной ткани
Несвежее	6,7	Множество палочек, на стекле распавшаяся мышечная ткань

Препарат-отпечаток из несвежего мяса окрашивается контрастно. В поле зрения из поверхностных и глубинных слоев большое количество палочек. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют и в одном поле зрения можно насчитать несколько сотен палочек. На стекле обнаруживается большое количество распавшейся ткани мяса.

Бактериологическое исследования мяса проводят для обнаружения микроорганизмов, вызывающих отравления, к их числу относят *E. coli*, *Salmonella*, *Staph. aureus*, *P. vulgaris*, *C1. botulinum*. Для определения наличия бактерий кишечного-паратифозного семейства делают посев на агар Эндо, прикладывая кусочек мяса местом свежего среза. После выращивания в термостате при 37°C в течение 20–24 часов изучают появившиеся колонии.

При обсеменении исследуемого мяса кишечной палочкой вырастают колонии, окрашенные в красный цвет с

металлическим оттенком, сальмонеллой – неокрашенные колонии.

Для установления палочки протей, которая выявляет антисанитарные условия хранения мяса, применяют метод Шукевича. Для этого делают соскоб с поверхности исследуемого мяса бактериологической петлей и проводят посев в конденсат свежескошенного агара. Определяя стафилококк, продуцирующий токсин, делают посев исследуемого мяса на соленый агар в чашках Петри. После культивирования (+37°C) на поверхности агара появляются характерные колонии S-формы, окрашенные в золотистый цвет.

Микробиологическое исследование кормов

Для бактериологического исследования отбор проб при наличии затаренной продукции проводят согласно табл. 3.

При наличии незатаренной продукции пробы берут не менее чем из 20 мест однородной партии со всей площади насыпи. Пробы можно отбирать в том же количестве с периодическими интервалами при погрузке и выгрузке из транспортных средств и бункеров.

Таблица 3 – Нормы отбора проб затаренных кормов

Количество упаковочных единиц	От какого количества упаковочных единиц отбирают пробы
до 10	от каждой упаковочной единицы
от 11 до 100	от 10 упаковочных единиц
от 101 и больше	от 10 упаковочных единиц и дополнительно по 3 из каждых 100 упаковочных единиц

Однородной партией считается количество корма, которое изготавливается по единой технологии в одну смену,

затаренное в мешки или в незатаренном виде (насыпью) и доставленное одним видом транспорта. Отбор проб проводят сухим, стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждой партии пробный щуп очищают и дезинфицируют. Масса первичной пробы должна быть не менее 100 г.

Для бактериологического исследования от каждой партии корма составляют два средних образца весом не менее 500 г. Один направляют в лабораторию, а другой сохраняют на предприятии (хозяйстве) до окончания исследования.

Для упаковки средних образцов применяют стерильную пластмассовую или стеклянную тару. Об отборе проб составляют акты в двух экземплярах с данными: название организации, вид продукции, объем (масса) партии, вид упаковки (тары), дата изготовления, дата отбора проб.

При бактериологическом исследовании кормов растительного и животного происхождения определяют показатели:

- общее количество микробных клеток;
- наличие сальмонелл;
- наличие энтеропатогенных типов кишечных палочек;
- наличие анаэробов;
- наличие бактерий рода *Proteus*;
- наличие пастерелл;
- наличие энтерококков.

Определение общего количества микробных клеток

В стерильную пробирку помещают 1 г корма, взятого из среднего образца, добавляют 9 мл физиологического раствора и тщательно встряхивают (получают разведение 1:10). Из полученной взвеси готовят последующие разведения (1:100, 1:1000, 1:10 000; 1:100 000; 1:1 000 000). По-

сле оседания взвешенных частиц из верхнего слоя жидкости делают посе́вы.

Для количественного учета микробного обсеменения в стерильные бактериологические чашки вносят по 1 мл каждого разведения и заливают 10–15 мл стерильного, расплавленного и охлажденного до температуры 44–45°C мясо-пептонного агара. Осторожно покачивая чашки, засеянный материал равномерно распределяют в агаре. После застывания среды чашки помещают в термостат при 30°C. После 72-часового культивирования проводят подсчет выросших колоний только в чашках, где содержатся не более 300 колоний. Результаты, полученные при подсчете колоний, умножают на степень разведений, суммируют и определяют количество микробов в 1 г корма.

Исследования на сальмонеллы методом последовательного обогащения. Навеску исследуемого материала 25–200 г (50 г от 10 и менее, 100 г от 11 до 100 и 200 г от 101 и выше упаковочных единиц) измельчают в стерильной фарфоровой ступке и вносят в колбу, содержащую среду предварительного обогащения (пептонная вода, МПБ с содержанием 5-процентного маннита) при соотношении материала и среды 1:5. Содержимое колбы тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37°C. Через 16–18 часов проводят посе́вы на бактериологические чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами: висмут-сульфит агар, средой Плоскирева или Левина (по две чашки) и на две (по выбору) основные среды обогащения (селенитовый бульон, магниевую среду) в соотношении 1:5. После 16–18 часов культивирования в термостате при 37°C из обогатительных сред проводят бакпосевы на чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами, которые помещают в термостат при 37°C. Засеянные чашки просматривают через 16, 24, 48 часов.

На висмут-сульфит агаре *S. typhi* и *S. paratyphi* растут в виде мелких, нежных, серовато-зеленых колоний с черным центром, *S. choleraesuis* – в виде зеленых колоний. Колонии почти всех других сальмонелл значительно крупнее, темно-коричневого цвета с металлическим блеском, окруженные светлым ореолом. Цвет участка среды под колонией черный.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде прозрачных или нежно-розовых колоний, на среде Левина – в виде прозрачных, бледных, нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

В случае обнаружения колоний, подозрительных на сальмонеллы, их снимают и делают мазки, окрашивают по Граму. Сальмонеллы являются грамотрицательными палочками, не образуют спор и капсул.

Затем пересевают на МПБ, который помещают в термостат при 37°C на 4 часа (до помутнения), и засевают на трехсахарный (лактоза, глюкоза, сахарозам) «скошенный столбик» с мочевиной.

Высев делают на короткий пестрый ряд, включающий скошенный агар и среды Гиса с глюкозой, лактозой и сахарозой и МПА, а также на бульон Хоттингера для определения индола и сероводорода (для этих целей под пробку пробирки с бульоном вкладывают специальные индикаторные бумажки).

Культуры грамотрицательных подвижных палочек, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевины и не образующие индол, подвергают серологическому исследованию в реакции агглютинации на предметном стекле с набором агглютинирующих сывороток.

Исследования на энтеропатогенные типы кишечной палочки. 10 г корма помещают в колбу, содержащую 100 мл стерильного физиологического раствора, встряхивают

на шуттель-аппарате в течение 30 минут и из полученной взвеси готовят разведения 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000. По 1 мл каждого разведения вносят в пробирки со средами Кесслера или Кода. Посевы помещают в термостат при 43°C для первых двух сред и при 37°C – для последней. Через 24 часа учитывают рост по изменению цвета сред. Титр кишечной палочки устанавливают по наибольшему разведению, в котором еще наблюдался ее рост.

Из пробирок, где отмечается рост микробов, проводят посев на плотные дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина в чашках, разделенных на секторы для каждого разведения.

Для типичных колоний *E. coli* характерна круглая форма с гладкой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями розового, красного или малинового цвета с металлическим блеском или без него на среде Эндо или черного цвета на среде Левина.

Выросшие изолированные колонии S-формы (не менее 4) пересевают на МПБ, выдерживают в термостате при 37°C в течение 16–24 часа. Затем одну часть пробирок используют для приготовления мазков, посева на дифференциально-диагностические среды, заражения мышей; вторую – для приготовления автоклавированного антигена, если кипяченный антиген не будет агглютинироваться поливалентными (комплексными) коолициновыми. У выделенных культур определяют морфологические и культурально-биохимические свойства для их родовой дифференциации.

Исследования на анаэробы. 50 г корма растирают в стерильной ступке с физиологическим раствором и засевают в несколько пробирок со средой Китта – Тароцци, по две чашки со средами Вильсона – Блера и кровяным агаром по Цейслеру. Для уничтожения вегетативных форм

по одной пробирке с жидкими средами прогревают при 80°C в течение 20 минут.

Посевы помещают в термостат при 37°C. Инкубируют в анаэробных условиях. Результаты посевов регистрируют в первый же день. Почернение среды Вильсона – Блера в течение 1–3 часов после посева, а также быстрое начало роста на среде Китта – Тароцци (через 4–5 часов) при обильном газообразовании характерны для клостридий перфрингенс.

Рост клостридий ботулиnum, наблюдаемый обычно на 2–3-й день, характеризуется помутнением среды Китта – Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла. При обнаружении роста на среде Китта – Тароцци проводят микроскопическое исследование и выделение чистой культуры посевом на 2–3 чашки с кровавым агаром по Цейсслеру, их выдерживают в анаэробных условиях при 37°C в течение 24–48 часов. После отбирают культуры, которые классифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам.

Индикация бактерий рода *Proteus*. 50 г корма помещают в колбу с 500 мл стерильного физиологического раствора и тщательно встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 минут. Для количественного учета и получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала проводят по 1 мл с разведения 10^6 в конденсированную воду свежескошенного агара (метод Шукевича) или ТТХ-агара и по 0,5 мл на поверхность питательных сред Плоскирева или висмут-сульфит агара. После помещают в термостат при 37° на 18–24 часа. Просматривают посевы на скошенном МПА или ТТХ-агаре. Если регистрируют «ползучий» нежный вуалеобразный рост на МПА или нежно-розовый (на ТТХ-агаре), то определяют по наименьшему количеству засеянного материала, в котором обнаруживают бактерии рода *Proteus*.

Просматривают чашки с посевами и отмечают колонии, подходящие для дальнейшего исследования. На среде Плоскирева бактерии растут в виде прозрачных колоний, зона их роста окрашивается в желтоватый цвет; на висмут-сульфит агаре через 24 часа. Выбирают изолированные колонии темно-коричневого цвета.

Если рост 18–24-часовой культуры однородный, то для дальнейшего изучения используют не менее четырех колоний, при росте различных колоний – не менее шести. Для определения родовой принадлежности изучаемого штамма изолированные колонии пересеивают в пробирку с МПБ, из которого после 4–5-часовой инкубации при 37°C проводят посев на среды:

- агар с фенилаланином для определения фермента фенилаланиндезаминазы;
- бульон или пептонную воду для определения индола;
- среду с мочевиной для определения фермента уреазы;
- среду с 0,5-процентном мальтозы;
- скошенный агар или ТТХ-агар для серологического типирования и определения патогенности.

Среды помещают в термостат при 37°C на 16–18 часов. Наличие фермента фенилаланиндезаминазы определяют наслоением на скошенную поверхность среды 4–5 капель 10-процентного раствора хлорного железа. Появление интенсивной зеленой окраски свидетельствует о наличии фермента.

Гидролиз мочевины (наличие фермента уреазы) устанавливают по изменению цвета среды с желтого в красный. Индол можно определять путем наслоения на среду реактива Эрлиха (0,5 мл). Появление красного кольца на границе жидкостей через 2–5 минут свидетельствует о положительном результате.

Микроскопическое исследование. Протей морфологически представляет прямые грамтрицательные подвижные палочки длиной 1–3 мкм, шириной 0,4–0,8 мкм, встре-

чаются нитевидные формы. Не образует капсул и спор. Наличие фермента фенилаланиндезаминазы определяют наслоением на скошенную поверхность среды 4–5 капель 10-процентного раствора хлорного железа. Появление интенсивной окраски свидетельствует о наличии фермента. Грамотрицательные бактерии, гидролизующие мочевину, дезаминирующие фенилаланиндезаминазу, относят к роду *Proteus*. Штаммы, ферментирующие мальтозу и образующие индол, относят к *P. vulgaris*; штаммы, не ферментирующие мальтозу и не образующие индол – к *P. mirabilis*.

Исследования на пастереллы. Навеску корма 25 г помещают в колбу с бульоном Хоттингера или МПБ с 0,2-процентной глюкозой в соотношении 1:5 (125 мл среды и 25 г корма), тщательно перемешивают и помещают в термостат на 16–18 часов при 37°C для подрачивания микрофлоры. Затем из колбы делают посева на 2–3 чашки Петри МПА с 0,5-процентной глюкозой и одновременно заражают не менее трех мышей подкожно в дозе 0,2 мл.

После гибели мышей (обычно через 24–48 часов) и высева из внутренних органов (сердце, печень, селезенка, почка) делают мазки, окрашивают по Граму или Муромцеву и просматривают под микроскопом. Для получения чистой культуры проводят посев с внутренних органов мышей на МПА с 0,2-процентной глюкозой. Посевы выдерживают в термостате в течение 24 часов при 37°C. Из выросших, характерных по внешнему виду колоний (на МПА – мелкие, росинчатые, прозрачные колонии), отбирают 3–5 и исследуют на принадлежность к пастереллам по культурально-морфологическим свойствам.

Исследования на энтерококки. В колбу с 450 мл стерильного физиологического раствора помещают 50 г корма (разведение 1:10), тщательно встряхивают в шуттель-аппарате 30 мин. Из полученной взвеси готовят последовательные разведения 1:100 (10^2), 1:1000 (10^3), 1:10 000

(10^4). Из каждого разведения вносят по 1 мл в пробирки с щелочно-полимиксиновой средой. Посевы инкубируют в термостат при 37°C в течение 18–24 ч.

Из пробирок с измененным цветом среды в зеленый или желтый делают посев на плотную молочно-ингибиторную среду – МИС. Посевы инкубируют в термостат при 37°C в течение 24–48 часов. Через 24–48 часов изучают рост колоний на среде МИС, идентифицируя различные виды и варианты энтерококков: *Str. faecalis* и его варианты образуют на молочно-ингибиторной среде круглые, выпуклые, с ровными краями, черные, с металлическим блеском колонии; *Str. faecalis* на среде МИС растет в виде мелких, сероватых, иногда почти бесцветных колоний.

Микроскопическое исследование. Грамположительные кокки диаметром – 0,6–1,5 мкм. Форма сферическая, овоидная или ланцетовидная, сплюснутая в поперечнике. Располагаются попарно, цепочками (3–5 клеток) или скоплениями. В основном неподвижны, спор и капсул не образуют.

На жидкой питательной среде для стрептококков большинства серологических групп характерен придонный, часто поднимающийся по стенке пробирки, рост. Энтеро- и пневмококки образуют диффузное помутнение, энтерококки – более интенсивное, в дальнейшем – образование осадка: крошковатого, пылевидного, зернистого, хлопьевидного.

На глюкозо-кровяном агаре стрептококки растут в виде мелких, росинчатых, прозрачных или слегка мутноватых колоний с ровными краями, окруженных (патогенные виды) зоной гемолиза. Биохимические свойства у стрептококков варьируют в зависимости от вида. Выделенные культуры стрептококков дифференцируют на основании результатов определения их чувствительности к желчи,

оптохину, способности расти в питательных средах с повышенным содержанием хлорида и редуцировать метиленовую синь и других ферментативных свойств.

Оценка кормов. В кормах животного и растительного происхождения, комбикормах и рыбной муке должны отсутствовать сальмонеллы, энтеропатогенные типы кишечной палочки, пастереллы, энтерококки, бактерии рода *Proteus* и токсинообразующие анаэробы. Общее количество микробных клеток – не более 500 тыс. микробных тел в 1 г (КМФАнМ).

При обнаружении сальмонелл, энтеропатогенных типов кишечной палочки, энтерококков, пастерелл и бактерий рода *Proteus* корм запрещается использовать для животных без дополнительной обработки. Вторичную стерилизацию проводят в соответствии с технологическими режимами производства этих кормов или же этот корм подвергают проварке при температуре не ниже 100°C в течение 1 часа и дальнейшей обработке согласно установленному технологическому режиму приготовления кормов к скармливанию. При установлении в кормах анаэробных микроорганизмов и их токсинов запрещается их использование для животных без дополнительной термической обработки, которую проводят при 120–130°C в течение 2 часов.

После стерилизации корма подвергают бактериологическому исследованию с постановкой биопробы на наличие анаэробов и их токсинов. При получении отрицательных результатов они могут быть использованы на кормовые цели. При положительных результатах исследования эти корма уничтожают. Корма, производство которых связано с тепловой обработкой, имеющие бактериальную обсемененность свыше 500 тыс. микробных клеток в 1 г, при отсутствии патогенных микроорганизмов подлежат повторной стерилизации согласно технологическим ин-

струкциям или могут быть направлены для производства гранулированных кормов с термической обработкой, а также для проварки.

Контрольные вопросы

1. Как осуществляют отбор проб кормов для микробиологических исследований?
2. Опишите методику отбора проб яиц для микробиологического исследования?
3. На какие санитарно-микробиологические показатели исследуют корма?
4. Как проводят микологическое исследование кормов?
5. Опишите методы бактериологического исследования мяса.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 16 СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Цель занятия: ознакомиться с сущностью и техникой постановки серологических реакций. Освоить методику постановки реакции преципитации.

Взаимодействие микробного антигена и антител носит строго специфический характер и направлено в животном организме на нейтрализацию возбудителя и его токсинов. Взаимодействие антигена и антител *in vitro* при определенных условиях сопровождаются видимыми феноменами (агломинация, преципитация, иммунный лизис), что позво-

ляет использовать АГ-АТ реакции, получившие название серологических.

Биофабрики выпускают антигены и иммунные сыворотки известной специфической направленности (диагностические). При помощи таких сывороток в серологических реакциях можно идентифицировать неизвестный микроорганизм или, применяя известный антиген, обнаружить в организме антитела, синтезированные в ответ на внедрение возбудителя, и таким образом, поставить диагноз. Кроме того, серологические реакции можно использовать для оценки интенсивности иммунного ответа после вакцинации или перенесенной инфекционной болезни.

Реакция преципитации (РП) принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, в которой используют растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген-антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) – преципитацией, что расценивают как положительный результат реакции.

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов. Если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой; кислотный или щелочной термогидролиз – прогревание материала, например, в 1-процентном растворе уксусной кислоты или 0,1 н растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей. Часто применяют различные детергенты – дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д. Используют методы ферментативного разрушения микробных клеток.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии; принцип реакции преципитации использован в иммуноэлектрофорезе и встречном иммуноэлектрофорезе.

Реакция кольцепреципитации (РКП) или реакция преципитации по Асколи (1911) разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП – прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату.

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

Метод «наслаивания» антигена. В уленгуттовские пробирки (диаметр 2-3 мм) вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки 0,3-0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно наслаивают на поверхность сыворотки 0,1-0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов проводят на фоне темной бумаги. Через 1-2 минуты в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат).

Метод «подслаивания» антител. В пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли: 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген; 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор; 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных.

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных – отрицательный результат.

Микровариант РКП. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5-1,0 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1 – 1,5 см, закрывают верхнее отверстие капилляра указательным пальцем. Затем ватой удаляют излишки сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в раствор антигена и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают с таким расчетом, чтобы смесь сыворотки и антигена оказалась в середине капилляра, после чего закрепляют вертикально в пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантигенов,

то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий.

Таким образом, каждая пара антиген-антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3-4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле. Агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах.

В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические – анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антигены не должны выходить за пределы лунки на поверхности агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10-72 часа.

Учет результатов. Полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, то есть там, где все антитела связаны с антигеном. При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции.

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам.

2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации.

3. Реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры». Такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет.

С помощью реакции диффузионной преципитации можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. В этом случае в центральную лунку вносят известный растворимый антиген (бактериальный, вирусный), а в периферические – различные разведения исследуемой сывороткой крови.

Чтобы полосы преципитации стали более выраженными, платины обрабатывают солями кадмия. Пластины с готовым гелем отмывают в физиологическом растворе и заливают 0,65-процентным раствором сульфата кадмия. В результате через несколько минут полосы преципитации становятся более ярко выраженными.

Контрольные вопросы

1. Что такое серологические реакции? В чем сущность серологических реакций?
2. В чем сущность реакции преципитации?
3. Какие виды реакции преципитации используют с диагностической целью?

4. Опишите технику постановки метода «наслаивания» антигена.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 17
РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ:
ПРОБИРОЧНЫЙ МЕТОД,
КАПЕЛЬНЫЙ И ДРУГИЕ МОДИФИКАЦИИ.
ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ
СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛИМЕНТА

Цель занятия: изучить методику постановки реакции агглютинации и ее модификаций, реакцию связывания комплимента.

Реакция агглютинации (РА)

Разработано несколько вариантов реакции агглютинации, различающихся по методическому исполнению и цели исследования.

РА на стекле.

1. Для идентификации микроорганизма на обезжиренное предметное стекло наносят отдельно каплю известной агглютинирующей диагностической сыворотки, например, сальмонеллезной, и каплю физиологического раствора (контроль). Затем бактериологической петлей берут бактериальную массу изучаемой культуры из колонии в чашке Петри или с поверхности скошенного МПА в пробирке и суспендируют отдельно в иммунной сыворотке и физиологическом растворе до получения гомогенной взвеси. Результат учитывают через 2-4 минуты.

Учет результатов. В контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке появляются хлопья агглютината (положительный результат). В случае от-

сутствия феномена агглютинации делают заключение о том, что исследуемая культура бактерий не соответствует иммунной сыворотке.

2. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови проводят роз-бенгал пробой. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (окрашенные розовым-бенгальским клетки бруцелл). Компоненты тщательно смешивают покачиванием стекла и через 4 минуты учитывают результат.

Учет результатов. При положительной реакции появляются розовые хлопья агглютината. Серологическую реакцию подобного типа относится к качественной, так как с ее помощью можно выявлять антитела к возбудителю в сыворотке крови животного, но невозможно оценить их количественное содержание.

Пробирочная РА.

1. Схема постановки РА представлена в таблице 4.

Из 5-й пробирки удаляют 0,5 мл жидкости перед добавлением антигена. Одновременно по аналогичной схеме исследуют заведомо положительную и отрицательную сыворотки (положительный и отрицательный контроли).

Учет результатов начинают с контрольных пробирок – не должно быть спонтанной (неспецифической) агглютинации в 6-й пробирке (контроль антигена) и хлопьев осадка в 1-й пробирке (контроль сыворотки). В остальных пробирках наличие и интенсивность агглютинации учитывают визуально и оценивают в крестах:

++++ - полная агглютинация – хорошо выраженный осадок и полное просветление жидкости (агглютинировало 100% антигена);

+++ - неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком и со слабой опалесценцией жидкости (агглютинировало 75% антигена);

Таблица 4 – Схема постановки пробирочной РА для обнаружения антител в сыворотке крови

Компонент Реакции	Количество компонента (мл) в пробирке					
	1 (исходное разведение и контроль антигена)	2	3	4	5	6
Физиологический раствор	2,4	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка крови	0,1	0,5 из первой пробы	0,5 из первой пробы	последовательный перенос по 0,5 мл, начиная с третьей пробы		-
Полученное Разведение	1:25	1:25	1:50	1:100	1:200	-
Бруцеллезный антиген, 10 ⁹ кл/мл	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Конечное Разведение	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	-
Перемешивают встряхиванием. Инкубирование при 37-38°C 18-20 часов						

++ - частичная агглютинация с небольшим осадком, надосадочная жидкость мутная (агглютинировало 50% антигена);

+ - очень небольшой осадок, жидкость непрозрачная (агглютинировало 25% антигена);

- - отсутствие агглютинация, осадка нет, жидкость мутная.

За положительный результат принимают агглютинацию минимум на два креста. Максимальное разведение исследуемой сыворотки крови, обеспечивающее агглютина-

цию минимум на два креста или более, называют титром сыворотки. Титр сыворотки отражает количественное содержание антител в крови исследуемого животного.

Пробирочную РА используют не только для серодиагностики инфекционных болезней, но также для оценки активности диагностических агглютинирующих сывороток или интенсивности поствакцинального иммунологического ответа.

Количество антител может служить диагностическим критерием. Под диагностическим титром понимают минимальное количество антител к данному антигену в исследуемой сыворотке, заведомо превышающее количество нормальных антител к используемому в реакции антигену в сыворотке животного того же вида. При диагностическом титре антител и выше животное рассматривают как больное или переболевшее.

При некоторых инфекциях этот подход не всегда продуктивен, и тогда исследуют «парные сыворотки», то есть сыворотки, взятые от животного дважды с интервалом три-четыре недели. Причем первую пробу необходимо брать не позднее двух-трех суток после появления клинических симптомов болезни. На активный инфекционный процесс указывает существенное повышение титра антител во второй пробе.

2. Для идентификации микроорганизмов используют пробирочную РА, если из-за антигенного родства с различными видами или внутривидовым сероварами в РА на стекле микроорганизм идентифицировать не удалось.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА). Данную реакцию относят к серологической реакции осадочного типа. В ней используют растворимые микробные антигены, сорбированные на эритроцитах как носителях (антигенный диагностикум), или сорбированные на эритроцитах антитела известной иммунной сыворотки

(антительный диагностикум). Антигенные диагностикумы применяют для серологической диагностики, антительные – для обнаружения антигенов в исследуемом материале.

Приготовление антигенных диагностикумов. Дефибринированную кровь отмывают ФСБР три раза. Для стабилизации (фиксации) эритроцитов обрабатывают формальдегидом, глутаровым или акриловым альдегидом. Наиболее распространена формализация эритроцитов: 50-процентную суспензию эритроцитов смешивают с 50-процентным раствором формалина в соотношении 1:1, выдерживают, периодически встряхивая, при 37°C 2 часа и затем отмывают ФСБР три раза.

Эритроциты легко сорбируют на своей поверхности полисахариды, а после обработки танином и белки. Танинизацию проводят, смешивая 2,5-процентную суспензию эритроцитов и раствор танина (1:20000) в соотношении 1:1 с последующим выдерживанием при 37°C в течение 15 минут. Затем эритроциты отмывают ФСБР (три раза) и доводят концентрацию до исходной. Для сенсibilизации одного мл 2,5-процентной взвеси отмытых танинизированных эритроцитов объединяют с одним мл антигена и 4 мл ФСБР и выдерживают при 37 °C 2 часа.

После сенсibilизации эритроциты отмывают три раза и суспендируют в ФСБР, который содержит однопроцентной нормальной кроличьей сыворотки, обеспечивающей стабильность суспензии. Следует отметить, что оптимальное количество антигена для сенсibilизации эритроцитов определяют опытным путем в каждом случае.

Обнаружение антител в сыворотке крови. Сыворотку крови перед исследованием инактивируют в водяной бане при 56°C 30 минут и проверяют на наличие антител к антигенам собственно эритроцитов. Для удаления антиэритроцитарных антител исследуемую сыворотку крови пред-

варительно адсорбируют несенсибилизированными эритроцитами.

РНГА на стекле применяют для диагностики пуллороза – тифа птиц (качественная кровяная реакция не прямой гемагглютинация – ККРНГА). На сухое обезжиренное стекло глазной пипеткой наносят антиген и свежую кровь, взятую из гребня или подкрыльцовой вены птицы, и смешивают, покачивая стекло. Реакцию считают положительной при выпадении в течение двух минут в смеси крови с антигеном хлопьев коричневого цвета. Параллельно ставят контроли с позитивной и негативной сыворотками.

Пробирочная РНГА рекомендована для серологической диагностики многих инфекционных болезней. Например, для диагностики сальмонеллезов используют количественную РНГА. Эритроцитарный антиген содержит О-антигены сальмонеллы. Исследуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в полистероловых планшетах в объеме 0,5 мл от разведения 1:100 до 1:800. Затем в каждую лунку вносят 0,25 мл диагностикума. Компоненты перемешивают покачиванием планшета и выдерживают в термостате при 37°C 2-2,5 часа.

Результат РНГА оценивают в крестах:

- 1) +++++ - все эритроциты агглютинированы и в виде «зонтика» покрывают дно лунки;
- 2) +++ - агглютинированы почти все эритроциты; на фоне «зонтика» сформировано малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов;
- 3) ++ или + - «зонтик» плохо выражен, заметен осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде кольца;
- 4) - - эритроциты не склеены и осели на дно в виде узкого колечка с ровными краями, либо в виде пунктата или колечка.

Параллельно ставят контроли с заведомо положительной и отрицательной сыворотками.

Реакция Кумбса (РК). Данная серологическая реакция также основана на феномене агглютинации. Предназначена для выявления так называемых «неполных» антител, у которых только один активный центр, и по этой причине они могут специфическими взаимодействовать с детерминантами антигена, но реакция не завершается формированием макроскопическим видимых комплексов антиген-антитело. В частности, РК используют для серодиагностики бруцеллеза животных.

Предварительно сыворотки крови исследуют в обычной пробирочной РА. Исходя из результатов РА, для исследования берут пробирки с разведениями сыворотки, где нет агглютинации, но возможно произошло специфическое связывание «неполных» антител с бруцеллезными антигенами. Антиген из этих пробирок отмывают от не связавшихся (свободных) белков сыворотки крови центрифугированием.

К отмытому осадку корпускулярного бруцеллезного антигена добавляют 1 мл разведенной антиглобулиновой сывороткой, содержащей антитела к иммуноглобулинам сыворотки крови животных того вида, который исследуют на бруцеллез. Пробирки со смесью выдерживают при 37°C 18 часов, затем при комнатной температуре 2- 4 часа.

Учет результатов. В положительном случае бруцеллезный антиген будет агглютинировать, так как полные антитела антиглобулиновой сыворотки взаимодействуют с «неполными» антителами на поверхности бруцелл и вызывают агглютинацию корпускул антител.

Реакция связывания комплимента (РСК)

Данная реакция заключается во взаимодействии антигена с антителом. Ее устанавливают при помощи специальной индикаторной системы, которую лизирует комплемент.

РСК применяют как метод серологической диагностики и реже для обнаружения микробных антигенов в исследуемом материале. В РСК с одинаковым успехом можно использовать корпускулярные и растворимые антигены.

Комплимент не способен соединяться с антигеном (АГ) или с антителами (АТ) в отдельности, но реагирует с образовавшимся комплексом АГ-АТ. В РСК участвуют две системы АГ-АТ и комплимент.

Исследуемая АГ-АТ система: искомый компонент в ней может количественно варьировать или полностью отсутствовать. При взаимодействии комплимента с системой АГ-АТ видимые феномены отсутствуют.

Индикаторная АГ-АТ система состоит из эритроцитов барана (антиген) и гемолизина (антитела к эритроцитам барана). При взаимодействии комплимента с системой АГ-АТ наблюдают процесс иммунного лизиса эритроцитов. На конкуренции исследуемой и индикаторной систем АГ-АТ за комплимент основана диагностическая РСК.

РСК ставят в два этапа. Сначала в пробирку вносят исследуемую сыворотку крови, известный антиген и комплимент. Смесь реагентов выдерживают в водяной бане при 37°C 20-30 минут. Независимо от результата видимых изменений в пробирке не происходит. Чтобы выяснить результат, в пробирку вносят индикаторную систему (вторая фаза). После инкубирования всех компонентов учитывают результаты.

Компоненты РСК. При введении всех компонентов в строго определенном количественном соотношении реакция дает достоверные и воспроизводимые результаты.

В качестве солевого раствора для разведения компонентов используют физиологический раствор. Более стабильные результаты иммунного гемолиза получают при введении в раствор ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} поскольку они

необходимы для эффективного действия системы комплимента.

Эритроциты барана. Эритроциты дефибринированной крови барана отмывают физиологическим раствором (2500 оборотов в минуту три раза по 5 минут). В реакции обычно используют 2,5-процентную суспензию. При необходимости длительного использования ее хранят в растворе Ольсвера (хлорид натрия, лимонная кислота, цитрат натрия, декстроза, дистиллированная вода). Раствор стерилизуют автоклавированием и смешивают с кровью в соотношении 1:2. Эритроциты, хранящиеся в растворе Ольсвера при 4-6°C можно использовать в течение 30-40 суток.

Гемолизин выпускают биофабрики. Он представляет собой сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана, содержащего антитела к эритроцитам. На коробках с гемолизином указывают его активность в виде титра, определенного в реакции иммунного лизиса.

Комплимент – сыворотка крови морской свинки. Биофабрики выпускают комплимент в лиофилизированном виде (срок годности один год). В случае необходимости комплимент можно получить пункцией сердца морской свинки при помощи шприца с иглой.

Антиген: диагностические антигены для РСК готовят на биофабриках. На коробках с антигеном указывают его активность (титр антигена) в виде разведения, рекомендованного для использования РСК.

Титрование гемолизина. При достаточно длительном хранении необходимого определять активность гемолизина путем его титрования в реакции иммунного гемолиза. Результаты этого опыта показывают, в какой оптимальной концентрации необходимо вводить в РСК гемолизин, чтобы обеспечить работу индикаторной системы. Титром гемолизина называют его максимальное разведение, при котором в присутствии оптимального количества компли-

мента гемолизин способен обеспечить полный лизис суспензии эритроцитов.

При титровании готовят вспомогательные разведения гемолизина (табл. 5). Их переносят в 8 пустых пробирок и добавляют другие компоненты (табл. 6)

В приведенном примере титр гемолизина составляет 1:2000 (четвертая пробирка). Для постановки РСК обычно берут удвоенное количество гемолизина – в данном случае 1:1000 (рабочий титр).

Титрование комплимента. Комплимент титруют каждый раз в день постановки главного опыта РСК. За титр комплимента принимают его минимальное количество, которое вызывает полный лизис определенной дозы суспензии эритроцитов в присутствии рабочей дозы гемолизина. Комплимент титруют в гемолитической или бактериологической системе.

Титрование комплимента в гемолитической системе, например, может быть проведено по указанной схеме (табл. 7)

В данном примере титр комплимента составил 0,1 мл. Активность комплимента может снижать антиген и исследуемая сыворотка (антикомплиментарное действие). Чтобы нивелировать антикомплиментарность компонентов, комплимент берут в опыт на 20-40-процентный больше установленного титра. Для более точного определения титра рекомендуют титровать комплимент в присутствии сыворотки крови и антигена (титрование в бактериологической системе).

Например, при серодиагностике бруцеллеза комплимент титруют на негативной и позитивной сыворотках, полученных от животных того же вида, что и исследуемая сыворотка.

Таблица 5 - Приготовление вспомогательного ряда разведений гемолизина

Компонент	Количество компонента (мл) в пробирке							
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й
Физиологический раствор	0,8	0,9	1,4	1,9	2,4	2,9	3,4	3,9
Гемолизин в разведении 10^2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Полученное разведение гемолизина	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000

Таблица 6 – Схема титрования гемолизина

Компонент	Количество компонента (мл) в пробирке										
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й (контроль эритроцитов)	10-й (контроль комплимента)	
Гемолизин в возрастающих разведениях	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
Комплимент, разведенный в соотношении 1:20	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2
Эритроциты, 2,5-процентный суспензия	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор (вместо антигена и исследуемой сыворотки)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,6
Инкубирование в водяной бане при 37°C 10 минут											
Учет результатов	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	НГ	НГ		НГ

Примечание: ПГ - полный гемолиз; ЧГ – частичный гемолиз; НГ – нет гемолиза

Таблица 7 – Схема титрования комплимента в гемолитической системе

Компонент	Количество компонента (мл) в пробирке									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент (1:20)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Физиологический раствор	0,58	0,56	0,54	0,52	0,5	0,48	0,46	0,44	0,42	0,4
Индикаторная система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Инкубирование в водяной бане при 37°С 10 минут										
Учет результатов	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Таблица 8 - Схема титрования комплимента в бактериологической системе

Компонент реакции	Ряд пробирок в штативе	Количество компонентов (мл) в пробирке									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Негативная сывортка в разведении 1:5	первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплимент в разведении 1:20	первый	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
	второй	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
Физиологический раствор	первый	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
	второй	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Антиген в рабочем титре	первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	второй	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Физиологический раствор	первый	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Инкубирование в водяной бане при 37-38°C 20 минут											
Гемолитическая система (эритроциты барана+гемолизин)	первый	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	второй	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Компоненты перемешивают встряхиванием Инкубирование в водяной бане при 37-38°C 20 минут											
Учет результатов	первый	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	второй	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Каждую сыворотку разводят физиологическим раствором в соотношении 1:5 и прогревают в водяной бане для инактивации собственного комплимента: сыворотки крупного рогатого скота – при 60-62°C, лошадей – при 56-58°C, буйволов – при 62-64°C, ослов и мулов – при 64-65°C, овец и коз – при 58-60°C 30 мин, свиной – при 60-62°C 50 мин.

Схема титрования в бактериологической системе показана в таблице 8.

Титром комплимента считают минимальное его количество, которое обеспечивает полный гемолиз суспензии эритроцитов в пробирках с негативной сывороткой и антигеном и позитивной сывороткой без антигена. В данном случае титр комплимента равен 0,1 мл (5-я пробирка). В качестве рабочего титра берут количество комплимента на 0,02 мл больше, то есть 0,12мл.

Главный опыт РСК. Кроме исследуемых сывороток крови при постановки основного опыта РСК в качестве контрольных используют положительную и отрицательную сыворотки крови. Все сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1:5 и прогревают при 56-64°C в водяной бане для инактивации собственного комплимента. Схема главного опыта представлена в таблице 9.

Результат РСК учитывают по наличию или отсутствию гемолиза эритроцитов в пробирках и выражают в крестах:

1) ++++ - полная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость прозрачная);

2) +++ - задержка гемолиза сильно выражена (после оседания эритроцитов жидкость слабо-розового цвета);

3) ++ - частичная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость интенсивно окрашена в красный цвет);

Таблица 9 – Главный опыт РСК

Компонент	Количество компонента (мл) в пробирке						
	1	2	3	4	5	6	7
Исследуемая сыворотка крови, разведенная 1:5 (1:10)	0,2	-	-	0,2	-	-	-
Положительная сыворотка	-	0,2	-	-	-	-	-
Отрицательная сыворотка	-	-	0,2	-	-	-	-
Физиологический раствор	-	-	-	0,2	0,2	0,4	0,6
Комплимент в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
Инкубирование при 37°C 20-30 минут или при 0-2°C 18-20 часов							
Эритроциты, 2,5-процентная Суспензия	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Гемолизин в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Инкубирование при 37°C 20-30 минут							

Примечание: Если первый этап РСК проводят при 0-4°C 18-20 часов, то реакцию называют РДСК – реакция длительного связывания комплимента. РДСК более чувствительна, чем РСК.

4) + - слабая задержка гемолиза (незначительный осадок эритроцитов, жидкость интенсивно окрашена);

5) – полный гемолиз, осадка эритроцитов нет.

Как положительный результат РСК оценивают задержку гемолиза минимум на два креста и более.

Учет результатов начинают с контрольных пробирок:

1) 7-я пробирка – контроль физиологического раствора: гемолиза не должно быть;

2) 6-я пробирка – контроль индикаторной системы и комплимента: должен быть полный гемолиз;

3) 5-я пробирка – контроль антигена: должен быть полный гемолиз;

4) 3-я пробирка – контроль с отрицательной сывороткой: должен быть полный гемолиз;

5) 2-я пробирка – контроль с положительной сывороткой: должна быть задержка гемолиза.

Если все перечисленные контроли свидетельствуют о правильности приготовления компонентов реакции и выборе их доз, приступают к учету результатов РСК с исследуемой сывороткой крови.

Первоначально учитывают результаты в 4-й пробирке (безантигенный ряд) – контроль антикомплиментарности сыворотки. При полном гемолизе 4-й пробирки (отсутствие антикомплиментарности) можно учитывать результат в первой пробирке (антигенный ряд), где результат может варьировать от полного гемолиза (отрицательный результат) до полной задержки гемолиза (положительный результат).

Если исследуемая сыворотка антикомплиментарна, то результат в первой пробирке учитывать нельзя и от этого животного необходимо брать кровь для повторного исследования. Окончательный учет результатов РСК проводят через 18-20 часов, за это время нелизированные эритроциты оседают на дно пробирки.

Контрольные вопросы

1. В чем принцип реакции агглютинации?
2. Какие модификации реакции агглютинации применяют в микробиологической практике?
3. Как проводят приготовление антигенных диагностикумов?

4. В чем принцип реакции связывания комплимента?
5. Что такое гемолитическая система реакции связывания комплиментов?
6. Что такое комплимент?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 18

ИНДИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ И СТРЕПТОКОККОВ

Цель занятия: изучить этапы лабораторной диагностики и основные свойства возбудителей стафилококкозов, стрептококкозов.

Стафилококкоза. Бактериальные инфекции, вызываемые патогенными стафилококками, характеризуются преимущественно гноеродными процессами различной локализации. Проявляются в виде абсцессов, флегмон, маститов, метритов, пневмоний, сепсиса. Токсигенные штаммы стафилококков могут вызывать пищевые отравления у людей.

Возбудителями стафилококкозов являются, в основном, штаммы *Staphylococcus aureus*, реже *S. epidermidis* и некоторые другие виды рода *Staphylococcus*, семейства *Micrococaceae*.

Лабораторная диагностика стафилококкозов основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики берут раневой экссудат стерильными ватными

тампонами. Содержимое абсцессов отбирают стерильным шприцем. При маститах материалом служит секрет вымени.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму и на капсулу, микроскопируют. Клетки стафилококков грамположительные, сферической формы, диаметром 0,5-1 мкм, располагаются в виде скоплений неправильной формы, а также единично, парами и цепочками из трех- четырех клеток, спор не образуют, вирулентные штаммы могут образовывать капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Стафилококки – факультативные анаэробы, температурный оптимум 30-37°C, рН 7,2-7,4 к питательным средам неприхотливы, могут расти при повышенном содержании хлорида натрия. Исследуемый материал высевают на МПА, в МПБ, посеvy культивируют в условиях обычной атмосферы. При загрязнении материала посторонней микрофлорой используют питательные среды с селективными свойствами: солевые МПА, МПБ, желточно-солевой агар (ЖСА), 3,5-процентный МПА с добавлением 3 мл 0,1-процентного раствора кристаллвиолета. Широко используют посев исходного материала на кровяной МПА.

На плотных средах через 18-24 часа инкубирования вырастают колонии правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, диаметром 2-7 мм, непрозрачные. Цвет колоний зависит от типа вырабатываемого пигмента.

S.aureus синтезирует золотистый и белый пигмент. На кровяном МПА вирулентные штаммы обычно растут, формируя широкую зону бета-гемолиза. На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком. В МПБ рост стафилококков сопровождается ин-

тенсивным помутнением среды и образованием значительного осадка.

Из культур, выросших на питательных средах, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении бактерий с типичными для стафилококков культурально-морфологическими признаками приступают к изучению свойств, прямо или косвенно свидетельствующих о патогенности выделенного стафилококка.

Патогенные стафилококки в отличие от непатогенных образуют капсулу, выделяют гемолизин, фибринолизин, гиалуронидазу, плазмокоагулазу, желатиназу, ДНК-азу, лецитиназу, ферментируют маннит.

Протеин А также рассматривают как фактор патогенности стафилококков. Этот белок, находясь в составе клеточной стенки, связывает Fc-фрагмент IgG, что способствует снижению эффективности фагоцитоза. Для выявления протеина А смешивают суспензию эритроцитов, сенсibilизированных IgG, и клетки исследуемой культуры стафилококка. При наличии белка А стафилококки соединяются с иммуноглобулинами и вызывают агглютинацию эритроцитов.

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 млрд/мл и 1 млрд/мл. Каждое разведение культуры по 0,1 мл вводят внутрикожно кролику, предварительно удалив шерстный покров на месте инъекции. Результаты учитывают ежедневно на про-

тяжении 4-5 суток. В положительных случаях развивается некроз кожи.

Энтеротоксин продуцируют токсигенные штаммы. Пробу на энтеротоксин ставят при отравлениях. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде в атмосфере, содержащей 20 % оксида углерода в течение трех суток. Затем культуру стерилизуют фильтрованием 10-15 мл фильтрата, смешивают с равным объемом молока и скармливают 4-8 недельными котятам. При наличии энтеротоксина через 1-2 часа у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвота.

Стрептококкозы – инфекционные болезни, вызываемые бактериями рода *Streptococcus*, к которому относят 29 видов. Наибольшее значение в патологии сельскохозяйственных животных имеют следующие виды: *S.pneumonia* – возбудитель стрептококковой (диплококковой) септицемии молодняка сельскохозяйственных животных; *S.equi*, включающий в себя три подвида: *S.equi subsp.equi* – возбудитель мыта лошадей; *S.equi subsp.equisimillis* и *S.equi subsp.zooperidemicus*, который вызывает септические инфекции у других видов животных; *S.agalactiae* и *S.dysagalactiae* – этиологические агенты маститов крупного рогатого скота; *S.pyogenes* – возбудитель ряда заболеваний, преимущественно человека. Многие стрептококки, патогенные для животных, пока идентифицированы на уровне серологической группы и не получили видовых наименований.

Лабораторная диагностика стрептококкозов основана на результатах бактериологического исследования.

Материал для исследования. При подозрении на мыт прижизненно берут носовые истечения, содержимое абсцессов лимфатических узлов, для посмертной диагностики - кровь из сердца и кусочки паренхиматозных органов. При подозрении на диплококковую септицемию - кровь из

сердца, селезенка, печень, костный мозг. При стрептококковых маститах исследуют молоко из последних порций.

Микроскопическое исследование. Из исследуемого материала - из носовых истечений при мыте лошадей; из гноя, экссудата, молока при мастите; при диплококковой септицемии молодняка и пневмонии - из паренхиматозных органов готовят мазки-отпечатки, окрашивают на капсулы и по Граму. Стрептококки чаще имеют вид цепочек, состоящих из круглых или овальных грамположительных кокков диаметром 0,6–1,5 мкм, без спор и жгутиков.

Морфология некоторых стрептококков в препаратах из патматериала имеет некоторые особенности: у *S. pneumoniae* (по старой номенклатуре *Diplococcus lanceolatus*) парные кокки с удлинением концевой части, окруженные капсулой, что отразилось в названии; *S. equi* в мазках из гноя имеют вид длинных цепочек, а в препаратах из агаровой культуры - цепочки короче, при этом сами кокки сплюснены. *S. agalactiae* и *S. disagalactia* везде имеют вид обычных цепочек.

Препарат из патологического материала лучше окрашивать по Романовскому - Гимза или метиленовой синью, что дает нежный цвет и позволяет увидеть капсулу. Стрептококки представляют собой круглые или овальные грамположительные кокки диаметром 0,5–1,25 мкм; неподвижные; спор не образуют; располагаются парами или короткими цепочками в зависимости от вида возбудителя. Например, кокки возбудителя пневмонии и диплококковой септицемии в препаратах из патматериала располагаются парно и окружены четко видимой прозрачной капсулой. Мытный стрептококк в препаратах из гноя располагается в виде длинных цепочек из мелких сплюсненных кокков.

Выделение чистой культуры и ее идентификация. Стрептококки относятся к факультативным анаэробам, оптимальная температура культивирования 37 °С, рН 7,2–7,4.

При культивировании требуют специальные среды, в которые добавляют 1-процентный раствор глюкозы, 5–10-процентный стерильной инактивированной сыворотки крови кролика или барана.

Многие из них обладают гемолитическими свойствами. В зависимости от способа разрушения эритроцитов стрептококки делят на три группы: бета-гемолитический тип, образующий прозрачную зону гемолиза; альфа-гемолитический тип, образующий зеленоватую зону гемолиза; гамма-гемолитический тип, не вызывающий гемолиз эритроцитов.

При посеве на кровяном МПА *S. pneumoniae* образует круглые полупрозрачные колонии с альфа-гемолизом, в МПБ - равномерное помутнение. *S. equi* растет в виде мелких росинчатых колоний S-формы с узкой зоной бета-гемолиза, в МПБ происходит легкое помутнение, и со временем на дне появляется осадок в виде крупинок. У *S. agalactiae* (*S. disagalactia*) на кровяном МПА появляются мелкие сероватые колонии с бета-гемолизом, при росте на МПБ бульон остается прозрачный, а на дне образуется мелкозернистый осадок. *S. ruogenes* на кровяном МПА образует мелкие прозрачные S-формы колонии с зоной бета-гемолиза, в бульоне - равномерное помутнение, после которого он просветляется и на дне появляется зернистый осадок.

Для исключения стафилококковой и энтерококковой инфекции (род *Enterococcus*) выделенную культуру исследуют в нескольких направлениях. Характерной особенностью стрептококков является отсутствие каталазной активности: стафилококки образуют каталазу, стрептококки - нет.

Для дифференциации *S. ruogenes* от энтерококков полученную культуру вносят в МПБ, содержащий 40% желчи крупного рогатого скота и в МПБ с 6,5% хлорида

натрия. Энтерококки в отличие от гноеродных кокков растут на этих средах, что является дифференциальным признаком.

Также проверяют чувствительность выделенной культуры к желчи крупного рогатого скота. Для этого 0,5 мл исследуемой суточной бульонной культуры вносят в МПБ с 10% желчи и выдерживают в термостате 1 час. Чувствительные стрептококки лизируются, а энтерококки устойчивы к желчи. Для дифференциации *S. pneumoniae* от прочих стрептококков применяют тест чувствительности к оптохину, который угнетает рост практически всех выделенных возбудителей.

Определение фибринолизина (стрептокиназы.) Многие гемолитические стрептококки образуют стрептокиназу, активизирующую протеолитический фермент плазмы (плазмин), который растворяет коагулированную плазму.

Методика. Исследуемую культуру стрептококков бактериологической петлей наносят в одну точку в виде «бляшки» на агар с 12% цитрированной плазмы, так, чтобы во время культивирования в термостате появилась большая изолированная колония. Чашку Петри с посевом ставят в термостат при 37°C на 24 часа. В положительном случае в агаре вокруг колонии-бляшки появляется зона просветления.

Серогрупповую принадлежность выделенной культуры определяют в РП, применяя стрептококковые преципитирующие сыворотки, выпускаемые биологической промышленностью. Исследуемую культуру выращивают в МПБ в течение 18 часов. Затем 7–9 мл культуры центрифугируют; надосадочную жидкость удаляют; к осадку добавляют 0,3–0,4 мл 0,2 N раствора соляной кислоты; осадок суспендируют; взвесь прогревают в кипящей водяной бане 10 мин; охлаждают; добавляют каплю 0,04-

процентного спиртового раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,2 N раствором гидроксида натрия.

Жидкость приобретает бледно-розовый цвет, ее повторно центрифугируют в надосадочную жидкость, содержащую термостабильный полисахаридный антиген С и используют как антиген для постановки реакции кольцепреципитации.

По классификации Р. Ленсфильда, стрептококки на основании антигенных свойств полисахарида С можно отнести к той или иной серологической группе: А, В, С, D и т. д. *S. pneumoniae* не содержит групповой полисахарид, но является антигенно-гетерогенным видом, который дифференцируют на типы в РА. Стрептококки можно быстро идентифицировать при обработке мазков-отпечатков моноклональными антителами, мечеными флуоресцеинами.

Биопроба. Для изучения патогенных свойств выделенных культур проводят биопробу на молодых белых мышках. Для заражения используют свежевыделенную бульонную культуру, которую вводят внутрибрюшинно трем мышам по 0,5 мл. Культура считается патогенной при гибели двух мышей. Таким образом, заключительный бактериологический диагноз основывается на учете морфологических, тинкториальных, культурально-ферментативных и патогенных свойств возбудителя, выделенного из патологического материала.

Контрольные вопросы

1. По каким критериям дифференцируют патогенные и непатогенные стафилококки?
2. Каковы основные виды патогенных стрептококков?
3. По каким критериям дифференцируют гноеродные гемолитические и фекальные стрептококки?

4. Каковы культуральные, морфологические и тинкториальные свойства стрептококков?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 19 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА)

Цель занятия: изучить морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства *E. Coli*; ознакомиться с методами индикации *E. coli* в исследуемом материале.

Возбудителями колибактериоза (эшерихиоза) являются энтеропатогенные варианты *E. coli*, род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*.

Колібактеріоз - остропротекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных, включая птиц и пушных зверей. Исследования антигенного строения кишечной палочки показали, что возбудителями заболеваний являются патогенные серогруппы *E. coli*: у телят чаще выделяются серогруппы 08, 09, 015, 0101 и др; у поросят - 08, 09, 0137, 0138 и др; у человека - 026, 055, 0111 и др.

Лабораторная диагностика колибактериоза состоит из обнаружения возбудителя в исследуемом материале методами световой микроскопии, выделения чистой культуры, идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материалом для исследования служат кусочки паренхиматозных органов или трупы целиком (в зависимости от веса животных). Для прижизненной бактериологической диагностики колибактериоза в лабораторию посылают фекалии в стерильных пробирках не менее чем от пя-

ти больных животных, не подвергавшихся лечению химиотерапевтическими препаратами.

При микроскопии мазков из исследуемого материала готовят препараты из паренхиматозных органов, окрашивают по Граму. *E. coli* - мелкие, подвижные, грамотрицательные палочки с закругленными концами (2–3 мкм), спор и капсул не образуют, в препарате располагаются одиночно, беспорядочно.

Выделение чистой культуры и ее идентификация. Возбудитель относится к факультативным анаэробам, хорошо растет на обычных питательных средах при температуре 37–38°C, рН 7,2–7,4. На МПА образует круглые, серобелые колонии S-формы, на МПБ - интенсивное помутнение и рыхлый осадок на дне пробирки.

В первый день исследования делают посев из паренхиматозных органов на среду Эндо или Левина в чашках Петри методом отпечатков местом свежего среза или петель, распределяя его по поверхности так, чтобы выросли изолированные колонии.

На второй день просматривают чашки с посевами и отбирают колонии, характерные для эшерихий: круглые, S-формы, красные с металлическим блеском на Эндо, темно-фиолетовые на среде Левина, кирпично-красные - на бактоагаре Плоскирева.

Далее для выделения чистой культуры типичные для *E. coli* колонии отсевают на МПА и МПБ. У выделенных культур изучают морфологические, культуральные и ферментативные свойства. Ферментацию лактозы устанавливают посевом исследуемой культуры на среды Гисса. Для *E. coli* характерно расщепление лактозы, глюкозы и маннита с образованием кислоты и газа.

Для установления способности выделенной культуры расщеплять мочевины и образовывать сероводород ее вносят в трехсахарный агар с мочевиной и выращивают 24 ча-

са в термостате при 37°C. Бактерии кишечной палочки не расщепляют мочевины и не образуют сероводород, поэтому цвет среды не изменяется и столбик агара не чернеет.

Для определения способности утилизировать цитраты исследуемую культуру вносят на скошенный агар Симмонса, посева помещают на 24 часа в термостат при 37°C. Бактерии кишечной палочки не утилизируют цитраты (цитратотрицательные), поэтому цвет среды не меняется.

Серологическая идентификация *E. coli*. Для серологической идентификации, выделенной *E. coli*, применяют поливалентные и моновалентные О-коли агглютинирующие сыворотки, выпускаемые биологической промышленностью в лиофилизированном виде (по инструкции перед применением во флакон добавляют физраствор до первоначального объема).

Серогрупповую принадлежность эшерихий определяют только у культур, отнесенных по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду эшерихий. Для серологической идентификации готовят суточную культуру изучаемой кишечной палочки на скошенном МПА, которую смывают физраствором и смыв переносят в две сухие стерильные пробирки:

1) первую пробирку прогревают в течение 1 часа в кипящей водяной бане при 100°C для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов (с этой культурой ставят РА на предметном стекле);

2) вторую пробирку автоклавируют при температуре 120°C в течение 2 часов, для разрушения поверхностного термостабильного А-антигена (с этой культурой ставят РА только в том случае, если первая РА дала неспецифическую реакцию).

Обе прогретые культуры центрифугируют при 3000 оборотов в минуту в течение 20 минут. Надосадочную жидкость сливают, а осадок используют в качестве антиге-

на для постановки РА на предметном стекле. Оставшуюся часть антигена разводят физиологическим раствором до концентрации клеток 5 млн/мл и ставят пробирочную реакцию. Определение серогрупповой принадлежности культур начинают с постановки РА на стекле с групповыми поливалентными сыворотками (их пять - 1, 2, 3, 4 и 0157):

1) 1-я поливалентная содержит антитела против серотипов 01, 02, 04, 08, 078, 0111, 0115, 0126;

2) 2-я поливалентная содержит антитела против серотипов 09, 015;

3) 3-я поливалентная содержит антитела против серотипов 033, 035;

4) 4-я поливалентная содержит антитела против серотипов 0555, 0127;

5) 5-я поливалентная содержит антитела только против серотипа 0157.

На чистые предметные стекла наносят по капле поливалентных сывороток, взятых из набора. В каждую каплю сыворотки петлей вносят прогретую, осажденную центрифугированием культуру *E. coli*, и хорошо перемешивают.

Реакция протекает при температуре 18–20°C. Учитывают ее в течение 3 минут. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и полным или частичным просветлением жидкости в капле только с одной групповой сывороткой. Положительная РА с поливалентной сывороткой подтверждает принадлежность этой культуры к роду *Escherichia*. При отрицательном результате РА антиген не изменяется (не склеивается) и остается в виде равномерной взвеси.

Для окончательного определения серогруппы каждую культуру, которая агглютинируется одной из испытанных поливалентных сывороток, исследуют в РА на стекле с моновалентными, входящими в состав данной по-

ливалентной сыворотки, разведенными 1:10. Исследуемую культуру относят к той серогруппе (определяют по этикетке), с сывороткой которой она дает положительную реакцию.

Постановка РА сопровождается следующими контролями:

1) антиген, приготовленный из выделенной кишечной палочки + физраствор (для исключения самоагглютинации контролируют качество антигена и физраствора); реакция должна быть отрицательной;

2) антиген из известного штамма кишечной палочки, то есть специфический + положительная сыворотка; пробирка будет служить эталоном положительной реакции;

3) пробирка с сывороткой, разведенной 1:25 без добавления антигена, для исключения флотации.

Примечание: при появлении неспецифической реакции постановку РА на предметном стекле повторяют с автоклавированной культурой.

Биопроба для определения патогенных свойств. Выделенную культуру сутки выращивают на МПА при 37⁰ С. Затем смывают физиологическим раствором, готовят суспензию концентрацией 1 млрд микробных клеток в 1 мл по оптическому стандарту мутности.

Трех белых мышей массой 14–16 г заражают внутрибрюшинно введением 0,5 мл бактериальной суспензии. За животными наблюдают в течение трех суток. В случае гибели двух (и более) зараженных мышей выделенную культуру считают патогенной.

Обнаружение грамотрицательных палочек, образующих характерные колонии на дифференциально-диагностических и элективных средах, ферментирующих лактозу и маннит, образующих индол, не расщепляющих мочевины, не разжижающих МПЖ, не образующих сероводород, дающих положительную реакцию с метиловым

красным и отрицательную реакцию Фогес - Проскауэра, образующих бактерий *E. coli*. лизиндекарбоксилазу, не растущих на среде Симмонса, а также дающих положительную серологическую реакцию с поливалентными и моновалентными О-коли агглютинирующими сыворотками, указывает на наличие в исследуемом материале бактерий *E. coli*.

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*?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 20 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА

Цель занятия: ознакомить студентов с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами возбудителя сальмонеллеза; изучить методы индикации возбудителя сальмонеллеза в исследуемом материале.

Лабораторная диагностика сальмонеллеза состоит из обнаружения возбудителя в исследуемом материале методами световой и люминесцентной микроскопии; выделения чистой культуры; идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Возбудители сальмонеллеза - бактерии из рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae*. Сальмонеллы внутри рода идентифицируют по антигенной структуре. Известно более 2200 серологических вариантов, каждый из

которых характеризуется определенным набором О- и Н-антигенов.

Материалом для исследования служат паренхиматозные органы, сердце, трубчатая кость, абортированный плод, трупы мелких животных. В первые дни болезни для прижизненной диагностики посылают фекалии больных животных, для получения гемокультуры - кровь.

Микроскопическое исследование. Из присланного материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают их по Граму и изучают морфологические свойства сальмонелл под микроскопом. По морфологии это небольшие палочки с закругленными концами от 2 до 4 мкм длины и 0,5–0,8 мкм ширины; в мазках располагаются одиночно, беспорядочно; подвижны (за исключением *S. Pullorum-gallinarum*); спор и капсул не образуют; по Граму окрашиваются отрицательно.

Выделение чистой культуры и ее идентификация. Сальмонеллы относятся к факультативным анаэробам, оптимальная температура культивирования - 37°C, рН 7,2–7,4. На МПА образуют небольшие серобелые колонии, S-формы, некоторые сальмонеллы по краю колонии образуют слизистый вал. На МПБ - различной степени помутнение, на дне серо-белый осадок, на поверхности некоторых видов пристеночное кольцо.

При первичном (прямом) посеве исследуемого материала применяют плотные элективные среды. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C, изучают культуральные и ферментативные свойства появившихся колоний. На дифференциально-диагностических и элективных средах сальмонеллы растут, образуя характерные колонии: на агаре Эндо - круглые, бесцветные или слегка розоватые колонии; на агаре Левина сальмонеллы растут в виде круглых, бледных или розовато-фиолетовых колоний.

В некоторых случаях, при небольшом количестве сальмонелл в исследуемом материале, проводят посев на жидкие среды обогащения (Кауфмана, Мюллера), содержащие компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Эти среды выдерживают сутки в термостате при температуре 37°C. Из них проводят пересев на плотные селективные среды (агар Плоски рева, ВСА), которые после термостатирования при температуре 37°C просматривают на присутствие колоний типичных или подозрительных на сальмонеллы.

На селективных средах сальмонеллы растут, образуя характерные колонии:

1. На бактоагаре Плоскирева сальмонеллы образуют бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо.

2. На висмут сульфитном агаре сальмонеллы, как правило, растут в виде черных или коричневых колоний с характерным металлическим блеском. При этом участок среды под колонией также прокрашивается в черный цвет. Исключение составляют некоторые серотипы из группы С, которые на этой среде растут в виде серовато-зеленых колоний.

Подтверждение наличия бактерий из рода сальмонелл проводят изучением биохимических и серологических свойств выделенной культуры. При обнаружении роста подозрительных колоний выборочно выделяют 3–5 колоний в каждой чашке. Из них готовят препараты, окрашивают по Граму, изучают подвижность.

Окончательно вид сальмонелл определяют методом серологической идентификации. Они имеют сложное антигенное строение и у них два основных антигенных комплекса: О-антиген (соматический) и Н-антиген (жгутиковый), имеющие значение при идентификации сальмонелл. В соответствии с содержанием О-антигенов сальмонеллы

разделены на ряд серологических групп, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита - А, В, С, D и Е.

Н-антигены могут существовать в двух фазах, выявляемых в серологических реакциях: специфической – обозначаются прописными буквами латинского алфавита; неспецифической – обозначаются арабскими цифрами или прописными буквами латинского алфавита. Сальмонеллы, у которых Н-антиген представлен двумя фазами, называются двухфазными, а имеющие антигены одной фазы - монофазными.

Таким образом, при серологической идентификации принимаются во внимание лишь два основных антигена - О и Н, и этот принцип положен в основу антигенной схемы Кауфмана - Уайта. Серологической идентификации подлежат только чистые культуры бактерий, отнесенные по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду сальмонелл.

Предприятиями биологической промышленности выпускаются наборы сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сывороток. Эти наборы позволяют определить родовую и серовариантную принадлежность 33 групп сальмонелл, чаще выделяемых из патматериала, из продуктов животного происхождения и объектов внешней среды. Сыворотки выпускаются двумя наборами. В набор №1 входят О-комплексные сыворотки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В набор №2 входят О- и Н-монорецепторные сыворотки.

Методика. В начале подготовленные чистые культуры испытывают с О-комплексными сыворотками. При этом РА на стекле ставят с каждой из О-комплексных сывороток последовательно, начиная с сыворотки №1 и до получения положительных реакций с двумя сыворотками.

Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю О-комплексной сыворотки. В каждую каплю сыво-

ротки вносят часть изучаемой культуры, снятой с агара колонии, которую, тщательно растирая до гомогенного состояния, соединяют с каплей сыворотки. Если сыворотка и бактериальная культура друг другу специфичны, то через 2–3 минуты происходит агглютинация бактериальных клеток - бактерии склеиваются в виде мелких комочков, реакционная жидкость при этом просветляется. По результатам РА с О-комплексными сыворотками устанавливают О-групповую (серогрупповую) принадлежность сальмонелл.

Далее для определения серовариантной принадлежности сальмонеллы, отнесенные к определенной О-группе, испытывают с Н-монорецепторными сыворотками 1-й и 2-й фазы. В выборе сывороток для реакции исходят из антигенной структуры сальмонелл той группы, к которой отнесена определяемая культура, с учетом вида животных, от которого она выделена.

Техника постановки РА аналогична таковой при использовании О-комплексных и монорецепторных сывороток. Только Н-агглютинат имеет вид крупных, легко разбивающихся хлопьев при полном или частичном просветлении капли. Одновременно с РА исследуемый материал засевают на трехсахарный агар Олькеницкого с мочевиной (глюкоза, лактоза, сахароза).

Пробирки со средой скашивают так, чтобы на дне остался столбик агара высотой не менее 3 см (готовая среда желтого цвета). Посев на трехсахарный агар делают сначала штрихом по скошенной поверхности, а затем уколом в глубину столбика. Культуру выращивают при 37°C в течение 16–18 часов. При наличии сальмонелл желтый цвет среды изменяется следующим образом: столбик становится розовым, скошенная поверхность цвет не изменяет. Образование газа определяют по наличию трещин и разрыву столбика агара, сероводорода - по почернению столбика.

Сальмонеллы, не образующие сероводород, не изменяют цвет питательной среды. Бактерии, не относящиеся к сальмонеллам, расщепляющие мочевину, окрашивают столбик и скошенную поверхность в ярко красный цвет, а бактерии, сбраживающие лактозу и сахарозу, изменяют цвет среды в синий. Если культуры ферментируют лактозу с образованием газа и расщепляют мочевину, они не принадлежат к бактериям рода сальмонелла.

К бактериям из рода сальмонелла относятся не ферментирующие лактозу, сахарозу и ферментирующие глюкозу и маннит (*S. typhi suis* не ферментирует маннит), образующие сероводород (*S. cholerae suis* и *S. typhi suis* сероводород не образуют) и не образующие индол.

Выявление сальмонелл прямым методом иммунофлуоресценции. Обнаружение в патологическом материале сальмонелл, входящих в серологические группы В, С1, С2, D1 и E1, возможно прямым методом иммунофлуоресценции с помощью комплексной и групповых сальмонеллезных флуоресцирующих сывороток. Комплексная сыворотка применяется для обнаружения сальмонелл, входящих в любую из серогрупп В, С1, С2, D1 или E1. Групповые адсорбированные сыворотки применяют для определения принадлежности выявленных сальмонелл к одной из указанных групп.

Методика. Из колоний, характерных для сальмонелл, или непосредственно из патологического материала готовят препараты, фиксируют химическим методом и на каждый мазок наносят по две капли флуоресцирующей сыворотки, разведенной по инструкции до рабочего разведения. Препараты помещают во влажную камеру, реакция продолжается 20 минут. Затем препараты в течение 5 минут обильно промывают физраствором, дополнительно - дистиллированной водой и подсушивают. После этого на мазок наносят нефлуоресцирующее масло, просматривают

под люминесцентным микроскопом при увеличении 590 и силе тока 4,1 А.

Сальмонеллы, окрашенные флуоресцирующей сывороткой, имеют светящийся периферический контур. Это специфическое свечение визуально оценивают от «++++» до «+». Диагностически положительным считается свечение не менее чем на «++», при условии, что в контрольных препаратах, окрашенных гетерологической сывороткой, свечение отсутствует.

Идентификация изучаемых сальмонелл также может быть проведена с помощью сальмонеллезного бактериофага, реакция с которым всегда высоко специфична.

Методика. На поверхность подсушенного МПА в чашке Петри наносят две капли взвеси молодой изучаемой культуры сальмонелл. Тонко оттянутой пастеркой на одну из капель наносят О-бактериофаг, на контрольную - каплю бульона (перед работой ампулу с бактериофагом разводят по инструкции). Чашку с нанесенными культурами и О-бактериофагом ставят в термостат, через сутки учитывают результаты.

Положительным результатом считают появление на месте внесения фага четко очерченной зоны лизиса с оценкой «++++», при наличии отдельных негативных колоний. В зависимости от их количества, реакцию оценивают на «+++», «++» или «+». При отрицательном результате - отсутствие негативных колоний в местах нанесения О-бактериофага - будет сплошной рост нанесенной культуры, как и в контрольной капле.

Обнаружение подвижных (кроме *S. pullorum* и *S. gallinarum*) палочек, отрицательных по Граму, не ферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не образующих индол, образующих сероводород, не разжижающих МПЖ, не расщепляющих мочевины, растущих на среде Симмонса

(усваивающих цитратно-аммонийные соли), дающих отрицательную реакцию Фогес - Проскауэра и положительную пробу с метиловым красным, дающих положительную РА с диагностическими О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, указывает на присутствие бактерий из рода сальмонелла. Если культура обладает ферментативными свойствами, типичными для сальмонелл, но не агглютинируется сальмонеллезными О- и Н-сыворотками, ее следует направить в Государственный институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

Контрольные вопросы

1. Какие дифференциально-диагностические среды используют для культивирования сальмонелл?
2. Каков характер роста колоний сальмонелл на среде Эндо?
3. Какой материал направляют в лабораторию при подозрении на сальмонеллез телят, поросят и птиц?
4. Какое количество сероваров входит в род *Salmonella*?
5. Какие антигены входят в состав сальмонелл?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 21

ИНДИКАЦИЯ РОЖИ СВИНЕЙ И ЛИСТЕРИОЗА

Цель занятия: изучить этапы лабораторной диагностики и свойства возбудителей рожи свиней и листериоза.

Рожи свиней – инфекционная болезнь, преимущественно свиней в возрасте 3-12 месяцев. Спорадически встречается у крупного рогатого скота, ягнят, пушных зверей, грызунов, птицы; восприимчив человек. Болезнь протекает остро и хронически. Острое течение характеризуется признаками септицемии, воспалительной эритремией, хроническое – эндокардитами и артритами.

Возбудитель рожи свиней – бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*, род *Erysipelothrix*.

Лабораторная диагностика рожи свиней основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют труп животного целиком или сердце, печень, селезенку, почку, трубчатую кость. Материал не консервируют или помещают в стерильный 30-процентный раствор глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой прямую или слегка изогнутую тонкую палочковидную грамположительную бактерию без спор, капсул и жгутиков размером 0,2-0,3х 0,8-2,5 мкм. Мазки-отпечатки из органов окрашивают по Граму и противорожистой люминисцирующей сывороткой. В

положительных случаях в материале находят мелкие грам-положительные палочки, располагающиеся одиночно, попарно или в виде скоплений. В препаратах из пораженных клапанов сердца при хроническом течении болезни возбудителя обнаруживают в форме нитей. В мазках, окрашенных люминесцирующей сывороткой, в положительных случаях находят светящиеся клетки бактерий типичной морфологии.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель рожи – факультативный анаэроб. В первых генерациях ведет себя как микроаэрофил. Температурный оптимум 36-37°C, рН 7,2-7,5. С целью выделения культуры возбудителя исследуемый материал засевают в МПБ или на МПА. Посевы культивируют 24-48 часов.

В МПБ возбудитель растет с очень слабым помутнением питательной среды, без образования пристеночного кольца или поверхностной пленки. Через 48-72 часа среда просветляется, на дне пробирки формируется незначительный осадок, поднимающийся при встряхивании в виде облачка.

На плотных средах возбудитель образует мелкие розинчатые колонии (S-форма), иногда крупные, с неровными краями и поверхностью (R – форма). Посевы на плотных средах из-за малых размеров колоний лучше просматривать при помощи лупы. Из культур, выросших на питательных средах, готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму и люминесцирующей сывороткой. При обнаружении бактерий, типичный для возбудителя рожи свиней по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам, у выделенных культур изучают ферментативные, серологические и патогенные свойства.

Возбудитель рожи разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу; не ферментирует эскулин, сахарозу, маннит, дульцит, рамнозу; не

образует каталазу, индол; выделяет сероводород; не растет в МПБ с 8,5-процентным хлорида натрия; вирулентные штаммы синтезируют гиалуронидазу.

Вид *E.rhusiopathiae* подразделяют на 22 серовара, которые обозначают цифрами. Наиболее распространены серовары первый и второй, которые ранее обозначили А и В. Для видовой серологической идентификации на практике используют обычную лечебно-профилактическую противорожистую сыворотку.

На предметное стекло наносят каплю иммунной сыворотки, разведенной физиологическим раствором (1:50), в которой затем тщательно суспендируют бактериологической петлей суточную агаровую исследуемую культуру. Через 1-2 минуты учитывают результат: возбудитель рожи агглютинирует в сыворотке.

Биопроба. Метод применяют для изоляции возбудителя из исследуемого материала, а также для определения патогенных свойств выделенных культур бактерий. Тканевый материал измельчают в ступке со стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вводят подкожно по 0,1-0,2 мл белым мышам массой 16-18 г.

При наличии возбудителя животные погибают через вторые-четвертые сутки после заражения. Заражение мышей слабовирулентными культурами, например, выделенными от свиней с хроническим течением болезни, может приводить к гибели животных в более поздние сроки или не вызывать летального исхода. Материал из трупов мышей подвергают бактериологическому исследованию.

Листерия

Листерия – бактериальная инфекция сельскохозяйственных животных многих видов, грызунов, птиц и человека. Характеризуется поражением центральной нервной системы, репродуктивных органов (аборт), молочной же-

лезы (маститы), признаками септицемии. Протекает остро и хронически.

Возбудитель листериоза – *Listeria monocytogenes*, род *Listeria*.

Лабораторная диагностика листериоза основана на результатах бактериологического исследования, в отдельных случаях применяют серологическую диагностику.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют трупы мелких животных (целиком); от крупных животных: голову (головной мозг), печень, селезенку, почки, пораженные участки легких; для прижизненной диагностики – абортированный плод с оболочками, истечения из половых органов, секрет пораженной доли вымени, в случае необходимости, кровь или сыворотку крови от больных или подозреваемых в заболевании животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой грамположительную палочковидную бактерию с закругленными концами, без спор, размером 0,5-2,0 мкм. Листерии при 20-22°C, но не выше 37-38°C образуют жгутики. При выращивании на сывороточных средах формируют капсулу. Из исследуемого материала готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, а также флюоресцирующими листериозными сыворотками. В тканевом материале листерии обнаруживают в виде грамположительных, нередко полиморфных палочек, располагающихся одиночно, парами, напо-

минающими римскую цифру пять, или по несколько штук параллельно.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Листерии – факультативные анаэробы, температурный оптимум 36-38°C, диапазон 4-45°C, способны расти на средах с повышенным содержанием хлорида натрия. Посевы из исследуемого материала делают в МПБ или печеночный бульон и на агар с добавлением 1% глюкозы и 2-3% глицерина на кровяной агар.

При исследовании загрязненного материала используют среды с селективными свойствами: МПА с теллуридом калия и полимиксином, среды, содержащие 10% хлорида натрия. Для увеличения концентрации возбудителя в исследуемом материале рекомендуют часть материала хранить при 4°C до 30 суток. При получении отрицательных результатов в первичных посевах следует с интервалом 10 суток делать повторные высевы на среды, что увеличивает вероятность выделения возбудителя. Посевы инкубируют при 37°C до двух недель.

На плотных питательных средах возбудитель растет в виде мелких росинчатых колоний, в косопроходящем свете – голубоватого цвета с зеленоватым оттенком и мелкозернистой структурой; на кровяном агаре вокруг колоний некоторых штаммов образуется зона бета-гемолиза. В МПБ рост возбудителя характеризуется слабым помутнением среды, через 5-7 дней на дне пробирки образуется слизистый осадок.

Для изучения подвижности культуру засевают уколом в полужидкий агар (0,2%), посевы культивируют при 20-22°C. Сначала возбудитель растет по уколу, затем рост распространяется по всему столбику питательной среды (подвижен). У выделенных культур бактерий изучают морфологические и тинкториальные свойства клеток, ферментативную активность.

Листерии разлагают с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, рамнозу, салицин, трегалозу, выделяют каталазу, обесцвечивают при росте в МПБ ряд красителей. Пробирки с индикаторными средами засевают исследуемой культурой, помещают в термостат при 37°C и учитывают результат через 3, 6, 24 и 48 часов. Помимо *L.monocetogenes* могут быть выделены другие виды листерий – *L.denitrificans*, *L.iwanonii*. Оба вида листерий патогены для мышей.

По 14 соматическим и 5 жгутиковым антигенам листерии подразделяют на 16 основных серотипов (сероваров).

Для видовой идентификации на предметное стекло наносят каплю поливалентной агглютинирующей сыворотке, в нее вносят суспензию 24-часовой агаровой культуры с концентрацией клеток $1 \cdot 10^{10}$ /мл. Результат учитывают через 3 минуты. Поливалентная сыворотка агглютинирует все антигенные варианты возбудителя, контролем служит суспензия бактерий в капле физиологического раствора. На втором этапе при помощи серотиповых сывороток определяют серотип выделенного возбудителя.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения возбудителя в исследуемом материале и изучения патогенных свойств бактерий. В первом случае тканевой суспензией заражают двух-трех белых мышей подкожно или внутрибрюшинно по 0,3-0,5 мл. В положительном случае мыши погибают через 2-6 суток, особенно чувствительны 5-6 дневные мышата, которые гибнут через 18-36 часов. Павших животных подвергают бактериологическому исследованию.

Конъюнктивальную пробу ставят для дифференциации выделенной культуры от возбудителя рожи свиней. На конъюнктиву глаза морской свинки наносят две капли бульонной культуры изучаемой бактерии. Вирулентные ли-

стерии на 2-4 сутки вызывают гнойный кератоконъюнктивит.

Серологическая диагностика. Серологические методы применяют в хозяйстве, где уже поставлен диагноз на листериоз, для выяснения эпизоотической ситуации. Используют пробирочную РА и РСК. Диагностический титр РА для крупного рогатого скота и лошадей 1:400 (1:200 сомнительный), для овец, коз и свиней – 1:200 (1:100 – сомнительный), для кроликов – 1:50. В РСК исследуют сыворотки крови, разведенные 1:10.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические, культуральные, ферментативные и патогенные свойства возбудителей рожи свиней, листериоза?
2. В чем состоит лабораторная диагностика рожи свиней и листериоза?
3. Какова антигенная структура возбудителей рожи свиней, листериоза и какие методы применяют для их серологической идентификации?
4. Какие методы используют для серологической диагностики листериоза?
5. Какие биопрепараты разработаны для специфической профилактики и диагностики листериоза и рожи свиней?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 22

ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

Цель занятия: изучить свойства возбудителя и методы лабораторной диагностики туберкулеза.

Туберкулез – это хроническое инфекционное заболевание домашних и диких животных, в том числе птиц, а также человека. Характеризуется образованием туберкулов (бугорков) в различных органах и тканях. Наиболее восприимчивы к туберкулезу крупный рогатый скот, свиньи и куры.

Возбудителя туберкулеза относят к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*. Наибольшее значение в патологии сельскохозяйственных животных (и человека) имеют следующие виды: *M. tuberculosis* - возбудитель туберкулеза человека, *M. bovis* – возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота, *M. avium* – возбудитель туберкулеза птиц.

Лабораторная диагностика туберкулеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным признакам.

Материал для исследования. От павших или убитых сельскохозяйственных животных с диагностической целью берут лимфатические узлы – заглочные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные, печеночные, надвыменные, а также кусочки печени, легких и селезенки. Тушки птиц направляют в лабораторию целиком – исследуют пораженные печень, легкие, селезенку, яичники. От живых животных берут пробы молока и спермы. При взя-

тии патологического материала необходимо соблюдать правила личной безопасности.

Материал доставляют в лабораторию свежим, в замороженном виде или консервируют 30-40-процентным водным раствором глицерина. Обсемененность патологического материала микобактериями туберкулеза может быть незначительной, поэтому для получения достоверных диагностических результатов специальными методами обработки повышают концентрацию возбудителя. К обработке предъявляют ряд требований: она должна обеспечивать гомогенизацию материала, уничтожить сопутствующую микрофлору, быть щадящей для микобактерий туберкулеза и способствовать их концентрации в материале.

Кусочки органов и тканей измельчают, заливают 3-10-процентным раствором серной кислоты в соотношении 1:4, пробу центрифугируют при 3000 оборотов в минуту 10-15 минут. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии (перед посевом осадок можно дополнительно отмыть физиологическим раствором два-три раза путем центрифугирования).

Пробу молока (150 мл) центрифугируют при 3000 оборотов в минуту 20-30 минут. Осадок обрабатывают 3-6-процентным раствором серной кислоты 20 -30 минут, тщательно взбалтывают и центрифугируют. Осадок высевают на питательные среды.

Яйца перед использованием инкубируют в термостате при 37-38°C 20 дней, после чего содержимое измельчают, обрабатывают 3-10-процентным раствором серной кислоты, центрифугируют и осадок используют для посевов и микроскопии.

Для концентрирования микобактерий в исследуемом материале применяют метод флотации. Материал гомогенизируют с физиологическим раствором до консистенции

сметаны и 10 мл гомогената, вносят в колбу с узким горлом на 250 мл, добавляют 10 мл однопроцентного раствора гидроксида натрия. Колбу закрывают и смесь встряхивают в течение 10 минут.

Затем смесь разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:9 и прибавляют 1-2 мл ксилола. Смесь вновь встряхивают в течение 5-10 минут, добавляют дистиллированную воду и оставляют при комнатной температуре на 30 минут.

Микотуберкулезные бактерии концентрируются во флотационном кольце у горлышка колбы вместе с каплями ксилола, которые, всплывая на поверхность, увлекают за собой и микобактерии. Содержимое образовавшегося кольца используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии, нанося материал на стекло несколько раз по мере просыхания.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Микобактерии – прямые или слегка изогнутые палочковидные клетки размером 0,2-0,6x1-10 мкм, без спор, капсул и жгутиков; грамположительные, кислото- и спиртоустойчивые. Кислотоустойчивость связана с присутствием в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты.

В цитоплазме располагаются кислотолабильные гранулы, состоящие в основном из метафосфата. Липиды и воскоподобные вещества придают микробной клетке гидрофобность, то есть способность отталкивать воду и водные растворы красителей, кислот, щелочей, в связи с чем бактерии туберкулеза плохо воспринимают окраску. Для окрашивания микобактерий применяют специальные методы, среди которых самый распространенный – метод Циль-Нильсена. По Циль-Нильсену микобактерии окрашиваются в ярко-красный цвет.

В препаратах *M.tuberculosis* обнаруживают в виде тонких прямых (изогнутых) палочек, *M.bovis* представляет

собой короткие и толстые палочки, *M. avium* мельче остальных видов, со склонностью к полиморфизму.

Бактериологический метод отличает невысокая чувствительность. С его помощью возбудитель выявляют при концентрации микобактерий 100-500 тыс кл/мл. Более результативны люминесцентная микроскопия, благодаря которой выявляют даже незначительное количество микобактерий, которые окрашены в бело-желтый цвет, а также формы с измененными тинкториальными свойствами.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Микобактерии – аэробы, температурный оптимум 37-38°C, рН 6,4-7,0. Растут медленно. Для культивирования микобактерий туберкулеза используют сложные питательные среды, содержащие глицерин, картофель, яйца, витамины. Рост бактерий стимулируют аспарагиновая кислота, альбумин, глюкоза, биотин, никотиновая кислота, соли аммония. Наиболее часто применяют среды Петраньяни. Левенштейна-Иенсена, Гальберга.

Рост микобактерий бычьего вида на плотных средах чаще обнаруживают на 20-60 сутки, человеческого вида – на 14-40 сутки, птичьего – на 10-20 сутки.

M. bovis на плотных питательных средах формирует мелкие гладкие шаровидные колонии цвета слоновой кости, иногда с морщинистым сероватым налетом. На жидких средах образует пленку на поверхности, сначала, в виде единичных островков, позднее – сливающихся в сплошную пленку.

M. tuberculosis на плотных питательных средах дает рост в виде сухого морщинистого налета кремового цвета. У колоний приподнятый центр, они крошковидные, с приятным запахом, по виду напоминают цветную капусту, плохо смачиваются водой. На жидких средах рост наблюдают на 5-7 сутки в виде сухой морщинистой пленки, поднимающейся на края пробирок, среда остается прозрачной.

На жидких средах и при внутриклеточном развитии образуется корд-фактор, способствующий сближению бактериальных клеток в микроколониях и их расположению в виде серпантинообразных кос, что можно наблюдать при микроскопическом исследовании. В средах, содержащих детергент, вследствие потери клетками гидрофобности наблюдают диффузный рост.

M. avium на плотных яичных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизистые, мягкие, серовато-белые, с возрастом желтеют, иногда образуют возвышение в виде пуговицы с кратерообразным углублением. При первичной изоляции из патологического материала колонии плоские и полупрозрачные. В жидких питательных средах возбудитель дает диффузный рост с формированием влажной жирной пленки, и образованием рыхлого осадка.

Биопроба. Метод применяют не только для обнаружения возбудителя в исследуемом материале, но и для определения его видовой принадлежности. Биопробу ставят параллельно с культуральными исследованиями.

Для определения вида заражают двух морских свинок, двух кроликов, при необходимости и двух кур. Перед постановкой биопробы морским свинкам и курам проводят туберкулинизацию. В опыт берут животных, не реагирующих на введение туберкулина.

Для заражения используют культуру или исследуемый материал, обработанный серной кислотой. Морским свинкам суспензию материала вводят по 1-2 мл подкожно в паховую область, кроликам – внутривенно, курам – в подкрыловую вену. За подопытными животными ведут наблюдение в течение трех месяцев. У морских свинок в положительных случаях через 2-3 недели на месте введения образуется уплотнение, потом язва, увеличиваются ре-

гионарные лимфоузлы. Через 30 суток после заражения свинкам повторяют туберкулинизацию.

При наличии клинических признаков заболевания и положительной реакции на туберкулин одну морскую свинку подвергают убою с последующим патологоанатомическим исследованием и приготовлением из пораженных органов мазков, которые окрашивают по методу Циля-Нильсена. При обнаружении в мазках микобактерий туберкулеза дают положительное заключение на туберкулез и биологическое исследование прекращают.

Возбудитель относят к тому или иному виду микобактерий, основываясь на следующих результатах биопробы.

Серологическая диагностика. Постановку РСК рекомендуют как дополнительный метод при отборе для диагностического уоя животных, положительно реагирующих на туберкулин.

Аллергическая диагностика. Не принадлежит к лабораторным методам, но на практике имеет ведущее значение для прижизненного определения инфекции у животных, в том числе у птиц.

Применяют сухой очищенный туберкулин (протеинпурифицированный дериват ППД), который вводят крупному рогатому скоту, буйволам, верблюдам, оленям в толщу кожи в области средней трети шеи, свиньям – на наружную поверхность основания уха, курам – в толщу кожи бородки. Реакцию учитывают через 72 часа, измеряя толщину кожной складки с учетом припухлости. Положительной реакцией считают тестоватый отек кожи размерами 35x45 мм и более, который на ощупь теплее окружающих тканей. Кожная складка увеличивается на 3 мм и более. Для измерения кожной складки используют кутиметр. У кур реакцию учитывают через 30-36 часов: при положительной реакции бородка опускается, становится горячей и отвисает.

Контрольные вопросы

1. Какова таксономическая характеристика возбудителей туберкулеза?
2. Каковы морфологические и тинкториальные особенности возбудителей туберкулеза?
3. В чем состоят культуральные особенности возбудителей туберкулеза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 23 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Цель занятия: изучить методы индикации возбудителя бруцеллеза в исследуемом материале; ознакомиться с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами возбудителя бруцеллеза.

Возбудителями бруцеллеза являются бактерии рода *Brucella*: *B. melitensis* - возбудитель бруцеллеза овец и коз; *B. abortus* - возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. suis* - возбудитель бруцеллеза свиней; *B. ovis* - возбудитель бруцеллеза овец; *B. neotomae* - возбудитель бруцеллеза крыс; *B. canis* - возбудитель бруцеллеза собак.

Лабораторная диагностика бруцеллеза состоит из обнаружения возбудителя в исследуемом материале методами световой и люминесцентной микроскопии; выделении чистой культуры; идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным, серологическим, патогенным свойствам и идентификации по комплексу признаков.

Материалом для прижизненной диагностики являются абортированный плод с околоплодными оболочками; для серологического исследования направляют сыворотку крови, молоко. При убое животных отбирают паренхима-

тозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов - семенники.

Микроскопическое исследование. Из присланного материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают их по Граму и изучают морфологические свойства сальмонелл под микроскопом.

Bruceella представляют собой коккобактерии или мелкие палочки величиной 0,5–1,5 мкм, неподвижные, грамотрицательные, истинной капсулы не образуют. В препаратах располагаются одиночно, беспорядочно, редко парами. Если исследуемый материал загрязнен посторонней микрофлорой, рекомендуется применить специальный метод окрашивания бруцелл по Козловскому, основанному на «феномене запаздывания» бруцелл к окрашиванию вторым красителем.

Методика окрашивания бруцелл по Козловскому.

1. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу (22 см), на которую наносят 2-процентный водный раствор сафранина и окрашивают в течение 2 минут при подогревании (до кипения не доводят). Все бактерии (бруцеллы и посторонние) принимают цвет сафранина.

2. Краску смывают водой.

3. Дополнительно окрашивают однопроцентным водным раствором малахитовой зелени - 30–60 секунд. За это время успевают окраситься только посторонние бактерии, а у бруцелл наблюдается «феномен запаздывания» к окрашиванию вторым красителем, поэтому они остаются розовыми.

4. Краску смывают водой.

Микрокартина – бруцеллы ярко-розовые, а посторонняя микрофлора успевает окраситься в зеленый цвет.

Выделение чистой культуры и ее идентификация. Возбудители *Bruceella* по типу дыхания являются аэробами или микроаэрофилами, оптимальная температура культиви-

вирования - 37°C при pH 6,8–7,4. Для выращивания бруцелл применяют специальные среды: мясопептонный печеночно-глюкозный глицериновый бульон и агар с добавлением однопроцентной глюкозы и 2–3% глицерина (МППГБ и МППГА); эритрит-агар, стимулирующий рост бруцелл; сывороточно-декстрозный агар с добавлением 10% сыворотки и одного процента декстрозы. При подозрении загрязнения исследуемого материала сопутствующей микрофлорой его засевают на среды с ингибиторами (генцианвиолет 1:200 000, уксуснокислый натрий 0,25 мг/мл).

Микроаэрофильные свойства проявляют такие возбудители, как *B. abortus*, *B. ovis*, которые при первичном выделении из патматериала требуют повышенное содержание оксида углерода (до 10–12% CO₂). Они растут медленно (до 30 дней), поэтому их рост контролируют и периодически просматривают посевы.

Типичные штаммы бруцелл на поверхности агара образуют мелкие прозрачные S-формы колонии, которые по мере старения мутнеют (не исключается появление R-форм). В бульоне наблюдается равномерное помутнение и пристеночное кольцо, на дне - рыхлый осадок.

Для идентификации и дифференциации выделенных культур ставят большое количество тестов. Изучают потребность в оксиде углерода; способность расти на питательных средах в присутствии некоторых ингибиторов (анилиновые краски – тионин и фуксин); выделение сероводорода и образование индола; ферментацию углеводов. Проверяют оксидазную и каталазную активность, подвижность, способность редуцировать нитраты, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, патогенность к лабораторным животным.

Определение потребности выделенных бруцелл в оксиде углерода проводится по следующей методике. Часть

пробирок с посевами помещают в эксикатор, в который через газомер вводят CO_2 до содержания 5–10%, эксикатор ставят в термостат и культивируют при 37°C. Одновременно другую часть посевов для контроля культивируют в обычных условиях. Полученные посевы сравнивают и анализируют. Дело осложняется тем, что некоторые биовары *B. abortus* могут вырасти и без повышенного содержания CO_2 .

Определение способности расти на питательных средах в присутствии некоторых ингибиторов. Для этого готовят питательные среды с анилиновыми красками в определенной концентрации - тионин (1:25000) и фуксин (1:50000). Так, культуры *B. abortus* и *B. melitensis* не растут на среде, содержащей тионин, а *B. ovis* растет на средах и с тионином и с фуксином.

Для выявления бруцелл непосредственно в патологическом материале, а также в объектах окружающей среды, предложен прямой метод иммунофлуоресценции. Непрямой метод позволяет обнаружить антитела в сыворотке больных, переболевших или вакцинированных животных.

Определение чувствительности к фагам проводят по следующей методике. Делают посев изучаемых бруцелл на поверхность питательной среды в чашке Петри сплошным газомом и на посев наносят капли фага на определенном расстоянии друг от друга. Чашки на сутки ставят в термостат при 37°C. В положительном случае появляются прозрачные зоны.

Для окончательной идентификации выделенных бруцелл ставят РА с диагностическими агглютинирующими R- и S- сыворотками.

Методика заключается в том, что на предметное стекло наносят капли R- и S-сывороток и каплю физраствора, в них суспендируют выделенную культуру. Если исследуемая культура даст положительную РА («++») и бо-

лее) с обеими или с одной из диагностических сывороток и отрицательную реакцию с физраствором, то ее относят к виду *Brucella*. Для контроля R-сыворотки проверяют в разведении, указанном биофабрикой, с роз-бенгал и цветными антигенами; S-сыворотки - в титре, указанном на упаковке с цветным антигеном и в неразведенном виде с роз-бенгал антигеном.

Для обнаружения бруцелл в патологическом материале, обильно обсемененном посторонней микрофлорой, проводят биопробу на восприимчивых морских свинках, которым подкожно вводят 1 мл суспензии (1:10) из исследуемого материала. У морских свинок бруцеллез протекает хронически, поэтому у них берут кровь на 15, 25, и 40-й день, в сыворотке которой в РА определяют наличие антигенов. Положительная РА в разведении 1:10 и выше свидетельствует о заражении бруцеллезом. Далее для выделения чистой культуры бруцелл морских свинок умерщвляют, делают посева из лимфоузлов, селезенки, печени и костного мозга.

Культуры бактерий, обладающие типичными морфологическими, тинкториальными, культуральными, ферментативными свойствами и давшие положительную РА с позитивной бруцеллезной сывороткой, относят к бруцеллам.

С помощью роз-бенгал пробы (РПБ) исследуют большое количество животных в сжатые сроки. РБП относится к качественным реакциям, так как с ее помощью можно выявить наличие антигенов в сыворотке крови больного животного, но нельзя определить их титр. Сыворотки, давшие положительную РБП, дополнительно исследуются в пробирочной РА и РСК.

Методика постановки РБП. На предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (это компонент биофаб-

ричного изготовления с этикеткой, и он представляет собой взвесь бруцелл, окрашенных розовым бенгальским). Осторожным покачиванием стекла компоненты перемешивают и через 3–5 минут учитывают результат. В положительном случае появляются розовые комочки агглютината.

Кольцевая реакция с молоком (КР) относится к ориентировочным, ее применяют для проверки благополучия по бруцеллезу молочных стад и для контроля молока на рынке.

Методика постановки КР. В бактериологические пробирки наливают по 2 мл исследуемого молока, добавляют 0,1 мл антигена (взвесь бруцелл, окрашенных гематоксилином). Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37°C на 45 минут. Содержимое окрашивается в фиолетовый цвет.

В положительном случае бруцеллы агглютинируют и адсорбируются на капельках жира, который, поднимаясь вверх, окрашивает тонкий слой сливок в фиолетовый цвет. Само молоко становится белым. В отрицательном случае, когда нет антител в молоке, неокрашенные сливки поднимаются вверх, образуют белое кольцо, а само молоко остается равномерно окрашенным в фиолетовый цвет. В сомнительном случае слой сливок слабо окрашен, столбик молока приобретает фиолетовый цвет.

Серологическая диагностика. При массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, розбенгал пробу (РБП на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР).

Пробирочную реакцию агглютинации ставят в объеме 1 мл. Сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, собак, пушных зверей, верблюдов разводят 0,5-процентным фенолизированным физиологическим раствором; сыворотки крови овец, коз, буйволов разводят 5-процентным, а сы-

воротки оленей – 10-процентным фенолизированным физиологическим раствором.

Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов исследуют в разведениях от 1:50 до 1:400; овец, коз, свиней, буйволов, оленей и собак - в разведениях 1:25 и более; пушных зверей - 1:10 и более. При массовых исследованиях сыворотки крови ограничиваются постановкой РА в двух первых разведениях.

После приготовления нужных разведений сыворотки в объеме 0,5 мл в каждую пробирку добавляют 0,5 мл разведенного до концентрации клеток $5 \cdot 10^8$ мл единого бруцеллезного антигена (при этом надо учитывать, что степень разведения исследуемой сыворотки в пробирке удваивается). Компоненты перемешивают осторожным встряхиванием, штатив с пробирками ставят в термостат при 37°C на 18–20 часов, затем оставляют на несколько часов при комнатной температуре. Результат учитывают по общепринятой системе. В качестве контрольной параллельно ставят реакцию с заведомо положительной и отрицательной сывороткой (это эталон положительной и отрицательной РА).

РА при бруцеллезе крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов считают положительной, если титр составляет 1:100 и более (1:50 сомнительный результат), у овец, коз, оленей, буйволов и собак - 1:50 (1:25 сомнительный результат). При получении сомнительных результатов у этих животных через 3–4 недели повторно берут кровь и с сывороткой вновь ставят РА. Обычно в ходе массовых серологических исследований ограничиваются постановкой реакции от каждого животного в первых двух разведениях.

Реакцию связывания комплемента (РСК) ставят в объеме 1 мл. Предварительно инактивированные в течение 30 минут сыворотки крови (лошадей - при 56–58°C; крупного рогатого скота и свиней - при 60–62°C, овец и коз -

при 58–60°C) исследуют в разведении 1:5–1:10. Положительным результатом РСК (РДСК) считают задержку гемолиза на «++» и более в разведении сыворотки крови 1:5.

Контрольные вопросы

1. Какой материал направляют в лабораторию для бактериологического исследования на бруцеллез?
2. В чем состоит бактериологическое исследование на бруцеллез?
3. Как ставят биопробу на бруцеллез?
4. Какие методы применяют для серологической диагностики бруцеллеза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 24 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Цель занятия: ознакомиться с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами возбудителя сибирской язвы; изучить методы индикации возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале.

Возбудитель сибирской язвы - бактерия *Bacillus anthracis*, род *Bacillus*. *Bacillus anthracis* является типичным представителем патогенных бацилл, относится к семейству *Bacillaceae* и роду *Bacillus*.

Лабораторная диагностика сибирской язвы состоит из обнаружения возбудителя в исследуемом материале методами световой и люминесцентной микроскопии; выделения чистой культуры; идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным и патогенным свойствам.

При подозрении на сибирскую язву категорически запрещается вскрывать трупы павших животных. Поэтому

материалом для лабораторного исследования является ухо павшего животного, на которое с особыми мерами предосторожности накладывают две лигатуры, а место среза прижигают.

Исследуемый материал помещают во влагонепроницаемую тару, пломбируют, указывают верх тары, оформляют сопроводительный документ и направляют в лабораторию.

Микроскопическое исследование. В лаборатории из крови уха готовят мазок, окрашивают по Граму, капсулы - по Ольту (или Михину), а также обрабатывают сибирезвенными люминесцирующими сыворотками. В препаратах, окрашенных по Граму, видны крупные грамположительные палочки (6–10 мкм), соединенные в короткие цепочки.

В препаратах, окрашенных по Ольту или Михину, концы палочек, обращенных друг к другу, резко обрублены и слегка втянуты, свободные концы закругленные, клетки окружены общей капсулой, что является важным диагностическим признаком. Микрокартина настолько специфична, что предварительный ответ дают немедленно по результатам исследования.

Для выделения чистой культуры возбудителя, который является факультативным анаэробом, исследуемый материал вносят в МПБ и МПА (рН 7,2–7,4) и выдерживают 24 часа в термостате при 37°C. Выросшие культуры просматривают, изучают культуральные свойства.

Типичные для *B. anthracis* крупные, серо-белые колонии R-формы, края которых под малым увеличением имеют вид завитков, получивших название «львиная грива». В препаратах, приготовленных из агаровой бактериальной культуры, бактерии располагаются в виде длинных цепочек. МПБ остается прозрачный, на дне появляется хлопьевидный осадок.

По мере старения бактерий, при накоплении продуктов метаболизма в культуральной жидкости, возбудитель сибирской язвы образует споры (бациллы), располагающиеся в центре палочки. Они не образуются при температуре ниже 12°C и выше 42°C, а также в живом организме или невскрытом трупe.

Для выделения чистой культуры возбудителя сибирской язвы из исследуемого материала, загрязненного посторонней микрофлорой, делают посев в селективные среды, в состав которых вводят 200–500 ЕД/мл полимиксина в сочетании с триметопримом, которые подавляют рост *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* и др. При появлении сомнительных данных в результате бактериологических исследований применяют дополнительные тесты с целью дифференциации выделенной культуры от сходных сапрофитных бацилл (например, *B. cereus*). При этом определяют способность выделенного возбудителя к капсулообразованию путем посева на сывороточные среды, патогенность для лабораторных животных, чувствительность к пенициллину и бактериофагу, гемолитическую активность, специфичность к сибиреязвенным люминесцирующим сывороткам.

Для дифференциации выделенной культуры от сапрофитов ставят тест «Жемчужное ожерелье». Для этого готовят ряд последовательных разведений пенициллина и три колбочки с 20 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА. В первую колбу вносят 10 ЕД пенициллина, получают агар, содержащий 0,5 ЕД/мл; во вторую колбу вносят 1 ЕД пенициллина и получают агар с 0,05 ЕД/мл пенициллина; третью колбу оставляют без пенициллина для контроля.

Содержимое всех трех колбочек разливают в стерильные пробирки по 5 мл в каждую и скашивают. Во все пробирки вносят по 0,25 мл 3-часовой исследуемой бульонной культуры. Посевы помещают в термостат при 37°C

в наклонном положении, так чтобы бульонная культура распределилась по всей поверхности косога агара. Через три часа из конденсационной жидкости пробирок берут каплю материала, делают мазок, высушивают на воздухе, фиксируют химическим методом и окрашивают простым методом или по Граму.

Под воздействием пенициллина только палочки сибирской язвы изменяются и приобретают шаровидную форму, появляется сходство с ожерельем из бус, поэтому при микроскопии такой культуры будут видны цепочки из шарообразных форм - феномен «Жемчужное ожерелье».

Споровые сапрофитные аэробы (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*), как правило, не образуют шарообразные формы, а сохраняют обычную форму палочек, то есть дают отрицательный ответ при постановке этого теста.

Для определения чувствительности выделенной культуры к сибиреязвенному бактериофагу ее засевают «методом газона» на поверхность МПА в чашке Петри. Затем на поверхность засеянной среды наносят каплю бактериофага в рабочем титре и дают ей стечь в виде дорожки. Посевы выдерживают в течение 24 часов в термостате при 37°C. В случае принадлежности исследуемой культуры к *B. anthracis*, в зоне нанесения бактериофага остается стерильная (вернее, прозрачная) полоса, при наличии роста культуры во всей чашке.

Иммунофлуоресцентный тест. Флуоресцирующую адсорбированную сыворотку, не дающую перекрестных реакций с антигеннородственными сапрофитными бациллами, применяют для идентификации выделенного возбудителя методом флуоресцирующих антител.

Определение способности выделенной культуры образовывать капсулу в условиях *in vitro*. На обычных питательных средах возбудитель сибирской язвы не образует

капсулу, но при добавлении сыворотки крови в питательную среду (например, в среду ГКИ) культура формирует капсулу.

Для проведения пробы готовят питательную среду ГКИ (к 60 мл раствора Хенкса добавляют 40 мл инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота, раствором двууглекислого натрия устанавливают рН 7,2) и разливают по 2 мл в пробирки, которые закрывают резиновыми пробками. Исследуемую культуру петлей вносят в пробирку со средой ГКИ, ставят в термостат при 37°C, результаты контролируют микроскопией. Через 60–120 минут у отдельных сибиреязвенных палочек начинается капсулообразование, а через 16–18 часов большинство из них образует капсулу.

Гемолитическую способность изучают посевом выделенной культуры на кровяном МПА в чашках Петри. Возбудитель сибирской язвы, в отличие от сапрофитов (*B. cereus*), не обладает гемолитическими свойствами, что является дифференцирующим признаком от сапрофитов.

Если для исследования поступил загнивший материал, из которого нельзя выделить чистую культуру сибирской язвы, то в нем определяют наличие специфических антигенов при помощи реакции кольцепреципитации. Для этого материал экстрагируют в течение 30–40 минут «горячим способом», то есть кипячением в физиологическом растворе (в соотношении 1:10). Полученный экстракт фильтруют через асбестовую вату и исследуют по обычной методике в РП.

Для постановки биопробы на животных, часть исследуемого материала растирают в ступке с небольшим количеством физиологического раствора. Двум белым мышам вводят 0,2–0,5 мл гомогената под кожу в области спины. Наблюдение ведут в течение 10 дней, в случае гибели мышей их вскрывают. Из крови сердца, печени, селезенки

и места заражения готовят мазки, а из органов делают посе­вы для выделения чистой культуры. Основанием для постановки диагноза на сибирскую язву является наличие в мазках из патологического материала капсулообразующих бактерий, а в препаратах из колоний - грамположительных, неподвижных бацилл; на питательных средах - характер­ный рост; чувствительность к пенициллину и бактериофагу, положительный тест в РП и положительный резуль­тат биологической пробы.

Контрольные вопросы

1. Каковы правила взятия патологического материала?
2. Какие методы применяют для бактериологической диагностики сибирской язвы?
3. Каковы морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B. anthracis*?
4. Как идентифицируют возбудитель сибирской язвы при помощи сибиреязвенного бактериофага?
5. Что такое феномен «ожерелья»?
6. Какие серологические методы применяют для обнаружения сибиреязвенного антигена в исследуемом материале?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 25 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СТОЛБНЯКА И БОТУЛИЗМА

Цель занятия: изучить методы лабораторной диагностики и биологических свойств возбудителей столбняка и ботулизма.

Столбняк – острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое токсином микроба *Clostridium tetani*. Характеризуется повышенной возбудимостью и судорожными сокращениями мускулатуры тела, приводящими к асфиксии, развивается в результате попадания спор возбудителя в раны. К возбудителю восприимчивы все виды домашних животных, особенно чувствительны лошади. Болезнь может возникнуть после родовых травм, кастрации, обрезания хвостов или пуповины у новорожденных, если при этих операциях были нарушены правила асептики и антисептики.

Возбудитель столбняка – *C. tetani*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, биохимическим и токсигенным свойствам.

Материал для исследования. Клиническая картина столбняка характерна, поэтому материал направляют для лабораторного исследования в сомнительных случаях. Им служит раневой экссудат, кусочки ткани из глубоких мест поражения.

Микроскопия препаратов из исходного материала. *C. tetani* – тонкая грамположительная спорообразующая па-

лочковидная бактерия размером 0,3-0,8x3-12 мкм. Споры терминальные, круглые, в два-три раза крупнее клетки, что придает ей форму «барабанной палочки». Возбудитель – перетрих, капсулу не формирует.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *S. tetani* – строгий анаэроб, температурный оптимум 37°C, рН 7,4-7,9. Исследования проводят с целью обнаружения токсина и выделения культуры возбудителя для последующего определения ее токсигенности. Чтобы выделить чистую культуру, материал высевают на среду Китта-Тароцци, содержащую 0,5% глюкозы. Половину посевов (пробирки) прогревают при 80°C в течение 1 часа.

Через 24 часа на среде Китта-Тароцци возбудитель дает интенсивное помутнение среды с незначительным газообразованием. Через 48-72 часа наступает просветление среды, а на дне пробирки образуется осадок. Для культуры характерен запах жженного рога (следствие протеолиза белков).

Через 4-5 суток полученной культуры определяют токсигенные свойства. При необходимости первичные посевы, содержащие типичные клетки возбудителя, прогревают при 80°C 20 минут и делают дробный посев на глюкозо-кровоной агар в чашках Петри. На кровяном агаре возбудитель столбняка образует нежные колонии с отростками и приподнятым центром, иногда мелкие круглые колонии. Некоторые колонии окружены зоной гемолиза.

У чистых культур возбудителя исследуют биохимические свойства. Столбняк гидролизует желатину, не образует индол, лецитиназу, расщепляет до кислоты глюкозу, мальтозу, фруктозу, свертывает молоко, образует сероводород.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения токсина в исследуемом материале, а также для подтверждения токсигенных свойств выделенной культуры возбудителя.

Для обнаружения токсина исследуемый материал растирают в физиологическом растворе, экстрагируют при комнатной температуре 1 час, фильтруют. Фильтрат вводят подкожно в заднюю лапку двум-трем белым мышам по 0,5-1,0 мл или двум морским свинкам по 3-5 мл.

При наличии токсина через 48-96 часа у животных развивается тетаническое сокращение мышц отдельных групп, а затем всей мускулатуры. Животное погибает в позе с вытянутыми лапками и искривлением позвоночника в сторону лапки, в которую вводили материал. При наличии токсина исследования по выделению культуры возбудителя прекращают.

Ботулизм – это остро текущий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбудителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы, а также люди. Из лабораторных животных – белые мыши и морские свинки. Возбудитель ботулизма – *Clostridium botulinum*.

Лабораторная диагностика возбудителя основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и его токсина методом биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и токсигенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы корма, вызвавшего отравления; от павших животных – содержимое желудка, кишечника, кусочки печени, селезенки; от больных животных – кровь. Материал берут в течение двух часов после гибели животного.

Нативный материал исследуют одновременно на наличие токсинов и возбудителя. Кровь исследуют только на токсин и быстро, на месте, так как токсин в крови быстро разрушается.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В препаратах из материала, окрашенных по Граму, *C. Botulinum* обнаруживают в форме прямой или слегка изогнутой с закругленными концами грамположительной палочки размером 0,6-1,4x4-9 мкм. Споры овальные, больше диаметра клетки, располагаются терминально или субтерминально, придавая клетке вид «теннисной ракетки». Возбудитель образует жгутики, не формирует капсулу.

Выделение и идентификация возбудителя. Основное направление при лабораторной диагностике ботулизма – обнаружение ботулинического токсина. Выделение чистой культуры с испытанием ее токсигенных свойств проводят только при отрицательных результатах исследований на наличие токсина в материале.

C. Botulinum – строгий анаэроб, температурный оптимум 30-35°C, pH 7,2-7,4. Чтобы выделить культуру возбудителя, исследуемый материал высевают в два флакона со средой Китта-Тароцци. Один из них прогревают при 80°C 1 час, затем оба флакона инкубируют. Рост возбудителя характеризуется постепенным помутнением среды (на 2-3 сутки), газообразованием.

У культуры отмечают специфический запах прогорклого масла. В культуре обнаруживают типичные для возбудителя клетки бактерий. На 5-7 сутки инкубирования испытывают токсигенные свойства культуры. Для выделения чистой культуры возбудителя первичные посеы прогревают при 80°C 1 час и дробно рассевают на глюкозно-кровянной агар в чашках Петри. Посеы инкубируют в анаэроостате. Через 4-5 сутки просматривают посеы. Ко-

лонии *C. Botulinum* круглые, с корневидными отростками, бесцветные или сероватые с зоной бета-гемолиза.

У выделенных культур определяют ферментативные свойства. Возбудитель медленно разжижает желатину, пептонизирует молоко, ферментирует до кислоты и газа глюкозу, мальтозу, салицин, глицерин, адонит.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения токсина в исследуемом материале или для определения токсигенных свойств выделенной культуры возбудителя. *C. Botulinum* продуцирует токсины семи типов: А, В, С, D, Е, F, G. Все семь сероваров экзотоксина иммунологически специфичны, что выявляют в реакции нейтрализации.

Для обнаружения токсина исследуемый материал (20-30 г) растирают в физиологическом растворе в соотношении 1:2, экстрагируют при комнатной температуре 2 часа, фильтруют через вату и делят на две части. Одну часть прогревают при 100°С 20-30 мин. Затем нативным и прогретым фильтратом заражают внутривенно или внутрибрюшинно двух белых мышей. Морских свинок заражают подкожно по 3-5 мл. При наличии ботулинического токсина животных, которым введен кипяченный фильтрат, остаются живыми, нативный – погибают на 2-5 сутки с характерной клиникой ботулизма: шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западание брюшной стенки («осиная талия»).

При обнаружении в исследуемом материале токсина проводят его идентификацию. Для этого смешивают по 0,2 мл различных антисывороток в одной пробирке, добавляют 1 мл экстракта, выдерживают 45 минут при 35-37°С и вводят внутрибрюшинно двум белым мышам.

Контрольным животным вводят смесь фильтрата с физиологическим раствором. При выживании мышей, зараженных смесью фильтрата и сыворотки, и при гибели контрольных токсин идентифицируют как ботулиниче-

ский. Этот результат служит достаточным основанием для постановки положительного диагноза на ботулизм. При необходимости определяют тип токсина в РН: смешивают по 2,4 мл фильтрата и 0,6 мл типовых сывороток, выдерживают в термостате и ставят биопробу на мышах.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические и культуральные признаки возбудителя столбняка?
2. Каковы особенности бактериологического исследования при столбняке?
3. Какой материал направляют в лабораторию для диагностического исследования при ботулизме?
4. Как определяют тип токсина *Cl.botulinum*?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 26 ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭМФИЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ОТЕКА

Цель занятия: изучить свойства возбудителей эмфизематозного карбункула и злокачественного отека, схему лабораторного исследования.

Эмфизематозный карбункул

Эмфизематозный карбункул (ЭМКАР) – острое инфекционное заболевание рогатого скота. Характеризуется развитием отечных крепитирующих припухлостей в мышечной ткани. К ЭМКАРу более восприимчив крупный рогатый скот, реже овцы и козы.

Возбудитель ЭМКАРа - *C. chauvoei*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика ЭМКАРа основана на результатах бактериологического исследования.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего очага. Пораженный участок разрезают в глубину и из средней части мышцы отбирают кусочки ткани размером 3 см³. При вскрытии трупа берут также кусочки печени и селезенки, кровь сердца. Материал для лабораторного исследования отбирают не позднее чем через 4 часа после гибели животного. В жаркое время года материал консервируют стерильным 30-процентным водным раствором глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. *S. chauvoei*- толстая крупная грамположительная палочка размером 0,5-1,6x1,5-9 мкм. Возбудитель – перитрих, образует споры в культуре и тканях, капсулу не формирует. Из нативного материала готовят мазки-отпечатки и окрашивают по Граму.

При микроскопии обнаруживают отдельные или парно лежащие полиморфные (веретенообразные, шаровидные, грушевидные) грамположительные палочки со спорами, расположенными центрально или субтерминально или находящимися отдельно от вегетативной клетки. Палочка со спорой может напоминать по форме точильный камень или разливательную ложку.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Строгий анаэроб, температурный оптимум 36-38°C. Исследуемый материал высевают на среду Китта-Тароцции, глюкозо-кровяной агар, МПА, в МПБ. При поступлении несвежего материала из него готовят суспензию на физиологическом растворе, которую прогревают при 80°C 15-20 минут для уничтожения сопутствующей микрофлоры и только после этого делают посев на питательные среды. Посевы культивируют 24-48 часов.

При росте *S. chauvoei* на среде Китта-Тароцции сначала наблюдают равномерное помутнение бульона, рас-

пределяющееся по всему столбику. Через 20-24 часа среда начинает просветляться и через двое суток становится прозрачной, а на дне пробирки образуется осадок микробных клеток. Газообразование незначительное.

На агаре Цейслера обнаруживают характерный рост колоний в виде перламутровой пуговицы или виноградного листа с образованием вокруг колоний неширокой зоны гемолиза.

Биопроба. Одновременно с посевами заражают лабораторных животных. Исследуемый материал измельчают, растирают в стерильной ступке с небольшим количеством МПБ. Полученную суспензию вводят подкожно в области брюшных мышц двум морским свинкам по 0,5-1 мл. При наличии в материале возбудителя животные погибают в течение 1-4 суток.

У павших морских свинок на коже в месте инъекции наблюдают серозно-геморрагический выпот, кровоизлияния. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом, мышцы темно-красного цвета. В паховых и реже подмышечных областях обнаруживают небольшие скопления газа. Кишечник не вздут, органы брюшной полости без видимых изменений.

В мазках-отпечатках с диафрагмальной поверхности печени обнаруживают отдельно лежащие палочковидные бактерии, что служит одним из дифференциальных признаков.

Злокачественный отек

Злокачественный отек – это неконтагиозное инфекционное заболевание животных всех видов, возникающее после ранений, травм, родов, кастраций. Характеризуется быстро увеличивающимися крепитирующими, болезненными отеками, распадом тканей и сепсисом.

У злокачественного отека полимикробная этиология. Основные возбудители: *Clostridium septicum*, *C.perfringens*, *C.novyi* (*oedematiens*), *C.histolyticum*, *C.sordellii*, а иногда *C. chauvoei*. Каждый из них может самостоятельно вызывать заболевание, но чаще их выделяют в ассоциации друг с другом или другими анаэробными и аэробными микроорганизмами (стафилококки, стрептококки и др.). Из сопутствующих микроорганизмов важную роль играет *C.sporogenes*, придающий процессу гнилостный характер и существенно отягощающий течение болезни. Возбудитель злокачественного отека относят к роду *Clostridium*.

Лабораторная диагностика злокачественного отека основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, тканевой экссудат и паренхиматозные органы, а при поражении половых органов – истечения из влагалища и кусочки органов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки отпечатки окрашивают по Граму. При микроскопировании отмечают форму микробных клеток, их взаимное расположение, тинкториальные свойства, образование спор и капсул, ориентируясь на характеристики возбудителей, изложенные в таблице 10.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудители – облигатные анаэробы, температурный оптимум 37-38°C. Исследуемый материал высевает на среды

Китта-Тароцци, Вильсон-Блера, культивируют 24-48 часов.

Посевы на средах в чашках Петри инкубируют в анаэроостате (крышкой вверх). В первичных посевах обычно вырастают смешанные культуры, поэтому, чтобы получить чистые культуры, из первичных посевов делают дробный рассев на глюкозо-кровоной агар Цейсслера в чашках Петри.

У выделенных культур изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, принимая во внимание данные по свойствам возбудителей, указанных в таблице 10, 11. При необходимости определяют токсигенные свойства возбудителей и тип токсина в реакции нейтрализации.

По антигенному составу токсических факторов различают 6 сероваров *S.perfringens* - А, В, С, D, Е, F.

S.perfringens серовар А вызывает злокачественный отек у людей и животных, пищевую токсикоинфекцию у лошадей, энтеротоксемию у телят и свиней, некротический мастит у рогатого скота.

Серовар В – возбудитель анаэробной дизентерии у ягнят, телят, поросят, козлят, жеребят.

Серовар С – вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец, телят, поросят, ягнят, коз, верблюдов.

Серовар D – возбудитель энтеротоксемии у овец, коз, телят, кроликов.

Серовар Е – выделяют при энтеротоксемии у телят и ягнят.

Серовар F – вызывает некротический энтерит людей.

По составу растворимых антигенов токсина различают четыре серовара *S.novyi* (*oedematiens*) – А, В, С, D.

Таблица 10 – Культурально-морфологические свойства возбудителей клостридиозов

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимум разрежения воздуха, мм. рт. ст.	Характеристики роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-кровяном агаре Цейсслера
1	2	3	4	5	6	7
<i>S. chauvoei</i>	+	Неравномерно окрашенные изолированные палочки, иногда расположены цепочкой по 3-4 клетки	От продолговатой до круглой, расположены центрально, субтерминально или лежат свободно	5-10	Равномерное слабое помутнение и газообразование, через 24 часа бульон просветляется	Круглые, плоские, приподнятые с ровными краями, напоминающие перламутровую пуговицу или виноградный лист; окружены узкой зоной прозрачного гемолиза

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
<i>S. septicum</i>	+	Изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек обнаруживают в виде нитей	Овальные, расположены субтерминально или центрально	8-15	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Нежный, бесцветный, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто нежными отростками; колонии окружены зоной гемолиза
<i>S. perfringens</i>	+	Толстые неподвижные палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно; образуют капсулу	Овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупа и молодых культур спор не обнаруживают	40	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые, серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета с двумя зонами. Среда буро-коричневого цвета

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
<i>C. novyi</i> (<i>oedematiens</i>)	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными или обрубленными концами, расположены одиночно, редко попарно или цепочками из 3-4 клеток	Овальные, расположены субтерминально или центрально	3-5	Рост более интенсивный внизу, через 18-24 часа бульон просветляется, на дне выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое	Шероховатые, корневидные, складчатые, с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать
<i>C. sordellii</i>	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2-4 клетки	Овальные, расположены субтерминально или центрально	8-15	Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур – слизистый осадок	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный, но может отсутствовать

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
<i>C. histolyticus</i>	+	Стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, попарно, редко цепочками	Овальные, расположены субтерминально («игольное ушко»)	8-15	Интенсивное помутнение без газообразования	Мелкие, круглые, гладкие колонии с ровными краями, гемолиз отсутствует, иногда незначительный

Таблица 11 – Ферментативные свойства патогенных клостридий

Вид микроорганизмов	Питательная среда									
	желатина	H ₂ S	молоко	глюкоза	сахароза	маннит	глицерин	салицин	мальтоза	галактоза
<i>C.perfringens</i>	разжижает на 3-5 сут	не выделяет	быстро свертывается	+	+	-	+/-	-	+	+
<i>C.novyi (oedematiens)</i>	разжижает на 2-4 сут	непостоянно	свертывается	+	-	-	-	-	+/-	-
<i>C.septicum</i>	разжижает на 2-4 сут	непостоянно	свертывается	+	-	-	-	+	+	-
<i>C. chauvoei</i>	разжижает на 2-6 сут	не выделяет	медленно свертывается	+	+	-	-	-	+	+
<i>C.histolyticus</i>	разжижает	непостоянно	пептонизация	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.sordellii</i>	разжижает	непостоянно	свертывается	+	-	-	-	-	+	-
<i>C.sporogenes</i>	разжижает	выделяет	пептонизация	-	-	-	-	-	-	-

Серовар А выделяют при злокачественном отеке животных и человека и при браздоте.

Серовар В – возбудитель некротического гепатита овец, крупного рогатого скота и свиней, газовой гангрены у людей.

Серовар С – вызывает хронический остеомиелит у буйволов.

Серовар D – возбудитель инфекционной иктерогемоглобинурии у крупного рогатого скота, овец и свиней.

Биопроба. Одновременно с посевом патологического материала на питательные среды заражают морских свинок. Патологический материал измельчают, тщательно растирают в стерильной ступке, добавляют небольшое количество МПБ. Полученную смесь вводят подкожно в область брюшных мышц двум морским свинкам массой 350-400 г по 0,5-1 мл. При наличии в исследуемом материале возбудителя злокачественного отека морские свинки погибают через 16-48 часов в зависимости от вида возбудителя. При вскрытии у павших животных обнаруживают патологоанатомические изменения, характерные для того или иного вида возбудителя.

Из ткани в месте введения патологического материала, а также из крови сердца, печени готовят мазки-отпечатки и делают посеvy на среду Китта-Тароцции, МПА и в МПБ.

Для проверки вирулентности выделенных культур суточную культуру, выращенную на среде Китта-Тароцции, вводят подкожно в область брюшных мышц двум морским свинкам в дозе 0,5-1 мл. Наблюдение за подопытными животными ведут в течение 8 суток.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают отек?
2. Какие среды применяют для культивирования клостридий?
3. Каковы отличительные признаки *Cl.perfringes* от других клостридий – возбудителей злокачественного отека?
4. На каких животных ставят биопробу при эмфизематозном карбункуле?
5. Каковы морфологические и культуральные свойства возбудителя эмфизематозного карбункула?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 27 ВОЗБУДИТЕЛИ МИКРОСПОРИИ, ТРИХОФИТИИ, ПАРШИ

Цель занятия: ознакомить обучающихся со свойствами возбудителей микозов, методами микологического исследования и этапами лабораторной диагностики трихофитии, микроспории, парши.

Трихофития – инфекционное заболевание. Характеризуется появлением на коже округлых или овальных облысевших очагов с мягкими, иногда сухими корочками в области головы. Поражения могут распространяться по поверхности тела животного.

При поверхностной форме размер повреждений 1-5 см в диаметре, иногда развиваются более обширные очаги. Корки легко отделяются вместе со склеенными волосами, под ними на слегка влажной поверхности кожи торчат обломавшиеся волосы, кое-где встречаются папулы и пузырьки.

При глубокой форме болезни наблюдают несколько очагов поражения с ярко выраженными экссудативными и воспалительными процессами, инфильтрацию, большое количество фолликулярных пустул. Встречаются множественные экссудативные поражения. Все очаги покрыты засохшим серозно-гнойным экссудатом. При удалении корок обнаруживают эрозии. Часто отмечают осложнения секундарной инфекцией.

Основные возбудители трихофитии: у крупного рогатого скота, буйволов, зебу, оленей - *Tr. verrucosum*, реже *Tr. mentagrophytes*, у лошадей - *Tr. Equinum* и *Tr. mentagrophytes*; у овец и коз - *Tr. Verrucosum*, *Tr. mentagrophytes*, у свиней - *Tr. mentagrophytes*, у верблюдов - *Tr. Verrucosum*, *Tr. sarkisovi*, у собак и кошек - *Tr. mentagrophytes*, у пушных зверей и кроликов - *Tr. mentagrophytes*, редко *Tr. Verrucosum*, у лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, морские свинки) - *Tr. mentagrophytes*, у птиц - *Tr. gallinae*. Этот возбудитель известен давно как возбудитель парши (фавуса) преимущественно у рода куриных. Раньше болезнь называли «белый гребень».

Микроспория. Инфекционное заболевание кожи и ее производных. Появление очагов поражения сопровождается воспалительным процессом, обламыванием и выпадением волос, иногда наблюдают поражение когтей.

Основные возбудители микроспории: у кошек и собак - *M. canis*; у лошадей - *M. equinum*, реже *M. distortum* и *M. gypseum*; у свиней, пушных зверей, кроликов и лабораторных животных - *M. canis*; у крупного рогатого скота - *M. canis* и *M. gypseum*. Микроспорией болеют дикие звери, а также животные зоопарков и цирков.

Лабораторная диагностика трихофитии и микроспории основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и люминесцентного анализа, выделение чистой культуры посевом на специальные питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют соскобы с пораженных частей тела животного вместе с корочками и чешуйками, пораженные волосы с участков, граничащих со здоровой кожей.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Чаще готовят неокрашенные препараты. Исследуемый материал помещают в чашки Петри, измельчают ножницами и расщепляют с помощью скальпеля. Затем кусочки волос, чешуек, корочек переносят на предметное стекло, наносят каплю 10-процентного раствора гидроксида натрия или гидроксида калия и слегка подогревают над пламенем горелки до отхождения паров.

После этого добавляют каплю 50-процентного водного раствора глицерина. На приготовленный препарат накладывают покровное стекло и просматривают сначала под малым увеличением сухого объектива х8, затем с объективом х40 или с помощью иммерсионной системы.

С целью дифференциации грибов рода *Trichophyton* и *Microporum* учитывают характер расположения спор в пораженном волосе, пользуясь критериями, приведенными в таблице 12.

Люминесцентный анализ заключается в следующем. Исследуемый материал помещают в чашки Петри на расстоянии 20 см от ртутно-кварцевой лампы ПРК-2 или ПРК-4 с фильтром Вуда и просматривают под ультрафиолетовыми лучами в затемненном помещении.

Таблица 12 – Критерии дифференциации грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum*

Trichophyton	Microsporum
Гриб располагается снаружи или внутри пораженного волоска в виде рядов септированного мицелия. Споры округлые или овальные, располагаются цепочками, как и мицелий, вокруг или внутри волоса. В чешуйках и на ранних стадиях поражения встречается ветвящийся мицелий. Споры <i>Tr. verrucosum</i> , <i>Tr. Equinum</i> более крупные, чем <i>Tr. mentagrophytes</i>	Споры мелкие – 3-5 мкм, беспорядочно располагаются у основания волоса (иногда образуя чехлы) или на его поверхности. Споры резко преломляют свет и плотно прилегают друг к другу. Искривление мицелия и распад его на споры обуславливают характерное для микроспории мозаичное расположение спор. В чешуйках встречается ветвящийся мицелий.

Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение. Корочки, чешуйки не светятся. Кроме того, с помощью люминесцентного анализа проводят раннюю диагностику атипичных и скрытых форм микроспории.

Обнаружение мицелия гриба и различных спор в материале – достаточное основание для постановки диагноза на дерматомикозы.

Выделение и идентификация культур возбудителей трихофитии и микроспории. Культуры выделяют в сомнительных случаях для подтверждения диагноза. Для получения чистой культуры грибов отдельные волосы или фрагменты кожи, корочки высевают на специальные питательные среды – агар Сабуро, сусло-агар, МПА, содержащий 2% глюкозы, агар Чапека и некоторые другие. Чтобы

освободить исследуемый материал от сопутствующей микрофлоры, перед посевом на питательные среды его обрабатывают 60-процентным этанолом в течение 5-7 минут, а затем дважды отмывают дистиллированной водой и подсушивают в термостате при 37°C, или же в питательные среды добавляют антибиотики (пенициллин, стрептомицин и др.) из расчета 100-200 ЕД/мл. Посевы инкубируют при температуре 26-28°C 20-30 суток и более.

У выросших культур грибов изучают культуральные и морфологические свойства. Готовят препараты «раздавленная капля» и микроскопируют. При идентификации видов руководствуются таблицей 13.

Таблица 13 – Дифференциальные культуральные и морфологические признаки грибов – дерматофитов

Время появления колоний	Характеристика колоний	Вегетативная и репродуктивная структура грибов
1	2	3
Tr.verrucosum (Tr.faviform) 30-40 дней	Плотные, возвышающиеся над средой, кожистые, складчатые колонии серовато-белого цвета, глубоко врастают в среду; могут быть без обильных складок	Септированный мицелий, цепочки артроспор, отдельные хламидоспоры, микроконидии, иногда овальной, грушевидной и палочковидной форм. В отдельных штаммах микроконидии из 2-8 сегментов.

Продолжение таблицы

1	2	3
<p><i>Tr.mentagrophytes</i> (<i>Tr.gypseum</i>) 3-4 дня</p>	<p>Колонии плоские, ровные, приподнятые, в центре в виде маленького бугорка. Поверхность мучнистая. Молодые культуры белые, с возрастом желтеют, могут вращать в среду с многочисленными радиальными лучами. Обратная сторона пигментирована: темно-красного, вишневого цвета.</p>	<p>Гифы образуют типичные спирали. Вдоль гифа по боковым нитям мицелия множество микроконидий округлой формы. Редко обнаруживают крупные макроконидии веретенообразной формы с 3-8 перегородками.</p>
<p><i>Tr.eguinum</i> 6-9 дней</p>	<p>На сусло-агаре белые бархатистые колонии с выраженными радиальными бороздками. Обратная сторона желтая.</p>	<p>Мицелий ветвящийся, множество округлых или грушевидных микроконидий. Большое количество рудиментарных микроконидий из 2-4 сегментов. Хламидоспоры единичные или отсутствуют.</p>
<p><i>Tr.sarkisovi</i></p>	<p>На сусло-агаре пушистые, ровные или кожистые, бугристые или складчатые колонии, вращают в питательную среду.</p>	<p>Одиночные микроконидии овальной формы, хламидоспоры одиночные или почками.</p>

Продолжение таблицы

1	2	3
Tr.gallinae	Молодые колонии гладкие, бархатистые, белого цвета. С возрастом складчатые, мучнистые, поверхность растрескивается. Иногда колонии розового или малинового цвета.	Мицелий септированный. Много микроконидий. Обнаруживают макроконидии с 2-6 перегородками. В старых культурах - хламидоспоры.
M.canis (M.lanosum) 2-4 дня	Первичные колонии плоские, сероватого или коричневого цвета с паутинистым растущим краем. Обратная сторона желтоватого цвета. При пересевах культура приобретает устойчивую белую окраску.	Мицелий ветвящийся, разной ширины, иногда с ракетобразными гифами. Много макроконидий веретенообразной формы с 5-12 перегородками. Обнаруживают микроконидии (алейроспоры) округлой или овальной формы.

Продолжение таблицы

1	2	3
<p><i>M. equinum</i> 6-8 дней</p>	<p>На сусло-агаре формирует кожистые складчатые колонии, покрытые серовато-белым мицелием. Глубоко врастает в питательную среду. Отдельные штаммы образуют кожистые колонии желтоватого или коричневого цвета без воздушного мицелия. На поверхности колоний много очерченных радиальных борозд, сходящихся в центре, у старых колоний кратерообразное углубление.</p>	<p>Мицелий ветвящийся, септированный, с возрастом утолщается и принимает четкообразный вид. В старых культурах множество интеркалярных и терминальных хламидоспор. Иногда обнаруживают многоклеточные макроконидии с 5-7 перегородками; редко микроконидии</p>
<p><i>M. gypsum</i></p>	<p>На сусло-агаре формирует плоские слегка желтоватые порошистые колонии, иногда окрашенные в белый цвет.</p>	<p>Мицелий ветвящийся, с ракетообразными утолщениями. Множество макроконидий с закругленными концами и 3-6 перегородками. Обнаруживают хламидоспоры и много микроконидий.</p>

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают микозы?
2. Какова схема лабораторного исследования микозов?
3. По каким критериям дифференцируют грибы рода *Microsporum* и *Trichophyton*?
4. Какие плесневые грибы вызывают микозы?

Список рекомендованной литературы

1. Асонов, Н. Р. Микробиология/ Н. Р. Асонов. – Москва : Колос, 1980. – 312 с.
2. Микробиология : учебное пособие / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, А. Х. Волков, А. И. Ибрагимова. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2019. — 496 с. — ISBN 978-5-8114-1180-1 // ЭБС Лань : [сайт]. — URL: <https://e.lanbook.com/book/112044>.
3. Госманов, Р. Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии : учебное пособие / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, А. А. Барсков. — Санкт-Петербург : Лань, 2014. — 384 с. — ISBN 978-5-8114-1625-7 // ЭБС Лань: [сайт]. — URL: <https://e.lanbook.com/book/45680>.
4. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология : учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. — Санкт-Петербург : Лань, 2014. — 624 с. — ISBN 978-5-8114-1540-3 // ЭБС Лань: [сайт]. — URL: <https://e.lanbook.com/book/39147>.
5. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник Ч. 1. Общая микробиология / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев. - Москва : КолосС, 2006. - 182, [1] с - ISBN 5-9532-0404-3.
6. Костенко, Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии /Т. С. Костенко. – Москва, 2001. – 272 с.
7. Костенко, Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко, В. Б. Родионова, Д. И. Скородумов. – М.: Колос, 2001. – 344 с.
8. Плешакова, В. И. Микробиология : учебное пособие / В. И. Плешакова, Н. А. Лещёва, Т. И. Лоренгель. — Омск : Омский ГАУ, 2019. — 75 с. — ISBN 978-5-

89764-826-9 // ЭБС Лань: [сайт]. — URL:
<https://e.lanbook.com/book/126624>.

9. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник / Н. А Радчук [и др.] ; ред. Н. А Радчук. - Москва : Агропромиздат, 1991. - 383 с. - ISBN 5-10-001805-4.

10. Тимаков, В. Д. Микробиология : учебник / В. Д. Тимаков, В. С. Левашев, Л. Б. Борисов. - 2-е изд., перераб.и. и доп. – Москва: Медицина, 1983. – 512 с.

Учебное издание

Якубик Ольга Леонидовна
Литвинова Зоя Александровна

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Подписано в печать 05.03.2021. Формат 60х90/16.

Усл. печ. л. –12,77. Уч.-изд. л. –7,65.

Печать по требованию. Заказ 72

Дальневосточный государственный аграрный университет.
г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86