

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Брянский государственный аграрный университет»

Г.Ф. Бовкун

**ВЕТЕРИНАРНАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ
И МИКОЛОГИЯ**

Учебно-методическое пособие с использованием
элементов учебно-исследовательской работы
для студентов по специальности
36.05.01 «Ветеринария»

Брянская область
2019

УДК 619(07)

ББК 48

Б 72

Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология и микология: учебно-методическое пособие с использованием элементов учебно-исследовательской работы. Брянск: Издательство Брянский ГАУ, 2019 – 198 с.

«Ветеринарная микробиология и микология»: учебно-методическое пособие с использованием элементов учебно-исследовательской работы составлено на основе требований Приказа ФГОС ВО – специалитет по специальности 36.05.01 «Ветеринария». Утвержден приказом Министерства образования и науки РФ от 22 сентября 2017 г. №974. Содержит современные сведения по разделам систематики, морфологии, физиологии, экологии микроорганизмов, а также методики бактериоскопических, бактериологических, серологических исследований, биологических свойствах возбудителей бактериальных болезней животных, методах диагностики, биопрепаратах, антибактериальных средствах лечения, методах контроля санитарного состояния кормов, молочных и мясных продуктов и соответствует содержанию компетенций УК-8, ОПК-1, ОПК-4, ОПК-6.

Рецензент: профессор кафедры вирусологии и радиобиологии им. академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, доктор биологических наук Е. И. Ярыгина.

Рекомендовано к изданию методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ, протокол №7 от 28.02.2019 года.

© Брянский ГАУ, 2019

© Бовкун Г.Ф., 2019

Содержание

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ТЕМА 1 Правила работы в бактериологической лаборатории. Приготовление мазков. Характеристика палочковидных, кокков и извитых форм бактерий | 5 |
| ТЕМА 2. Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов. Структура бактериальной клетки..... | 13 |
| ТЕМА 3. Сложные методы окрашивания. Питательные среды. Выделение чистых культур аэробов | 20 |
| ТЕМА 4. Культуральные свойства микроорганизмов. ... Фазы роста микроорганизмов. Работа второго дня по выделению чистых культур аэробов. Методы идентификации. Выделение чистых культур анаэробов | 28 |
| ТЕМА 5. Методы стерилизации. Химические противомикробные препараты. Методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП и фагам . | 35 |
| ТЕМА 6. Санитарно-гигиеническая оценка почвы. Круговорот азота и углерода. Микрофлора воды и воздуха, санитарно-бактериологическая оценка..... | 49 |
| ТЕМА 7. Санитарно-бактериологическая оценка молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений. Микрофлора тела животных..... | 64 |
| ТЕМА 8. Препараты специфической профилактики, терапии и диагностики инфекционных болезней..... | 71 |
| ТЕМА 9. Реакция агглютинации и современные разновидности..... | 78 |
| ТЕМА 10. Разновидности реакции преципитации. Реакция связывания комплемента (РСК)..... | 84 |
| ТЕМА 11. Патогенные кокки | 89 |
| ТЕМА 12. Лабораторная диагностика сибирской язвы, биопрепараты | 96 |
| ТЕМА 13. Лабораторная диагностика туберкулеза,..... паратуберкулеза | 101 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ТЕМА 14. Лабораторная диагностика бруцеллеза | 109 |
| ТЕМА 15. Возбудитель туляремии. Патогенные иерсинии | 114 |
| ТЕМА 16. Возбудитель пастереллеза. Лабораторная диагностика гемофилезов..... | 120 |
| ТЕМА 17. Возбудитель рожи свиней, листериоза | 126 |
| ТЕМА 18. Лабораторная диагностика эшерихиоза, биопрепараты | 132 |
| ТЕМА 19. Лабораторная диагностика сальмонеллезов, биопрепараты | 136 |
| ТЕМА 20. Лабораторная диагностика анаэробных инфекций (эмкара, столбняка, некробактериоза, ботулизма, копытной гнили), биопрепараты | 141 |
| ТЕМА 21. Возбудители злокачественного отека, браздота. Заболевания, вызываемые <i>C.l.perfringens</i> . | 148 |
| ТЕМА 22. Лабораторная диагностика лептоспироза, кампилобактериоза, дизентерии свиней, биопрепараты | 154 |
| ТЕМА 23. Лабораторная диагностика Курикетсиоза, хламидиозов животных, биопрепараты. | |
| Патогенные микоплазмы | 161 |
| ТЕМА 24. Возбудители аспергиллеза. Лабораторная диагностика трихофитии, микроспории, биопрепараты | 165 |
| ТЕМА 25. Лабораторная диагностика микотоксикозов, способы профилактики, лечения | 170 |
| ТЕМА 26. Санитарно-бактериологическая и микологическая оценка кормов..... | 175 |
| ТЕМА 27. Санитарно-микробиологическая оценка... кисломолочных продуктов, сливочного масла, сыров (самостоятельная работа)..... | 181 |
| ТЕМА 28. Санитарно-бактериологическая оценка мясопродуктов, яиц (самостоятельная работа) | 187 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 196 |

ТЕМА 1

Правила работы в бактериологической лаборатории.

Приготовление мазков.

Характеристика палочковидных, кокков и извитых форм бактерий

Цель занятия. Разобрать правила работы в бактериологической лаборатории, познакомиться с оборудованием рабочего места. Освоить метод бактериоскопического исследования, правила работы на монокулярном микроскопе Минимед-501. Разобрать характеристику палочковидных бактерий и кокков.

Оборудование материалы. Микроскопы, рабочие места бактериологов, взвеси микроорганизмов, краски, предметные стекла. Электронный ресурс, таблицы «Морфология микробов».

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести бактериоскопию взвесей микроорганизмов, результат зарисовать. 2. Познакомиться с морфологией палочковидных, кокков.

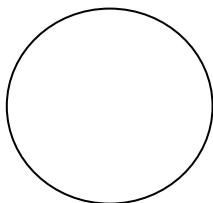


Рис. 1

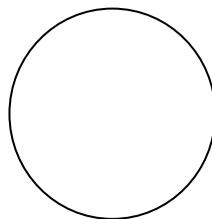


Рис. 2

Правила работы в бактериологической лаборатории

В бактериологической лаборатории работают с живыми микроорганизмами: болезнетворными, сапрофитами,

полезными, потери которых не должно быть в окружающую среду. В то же время микроорганизмы из окружающей среды не должны контаминировать биомассу изучаемых микроорганизмов, поэтому необходимо соблюдать правила внутреннего распорядка:

- все сотрудники работают в белых халатах, сменной обуви;

- в лаборатории запрещается принимать пищу, пользоваться жвачкой;

- личные вещи хранят в специально отведенном месте, рабочее место должно быть в образцовом порядке;

- при попадании заразного материала на стол, пол, это место обрабатывают дезинфицирующим раствором широкого спектра бактерицидного, вируцидного действия;

- хранение, наблюдение за культурами микроорганизмов проводят по специальной инструкции;

- сливают жидкие отходы в канализацию после обеззараживания дезинфицирующим раствором;

- после работы воздух в лаборатории обеззараживают ультрафиолетовым облучением;

- лабораторию покидают после тщательного мытья рук, без халата и сменной обуви.

Микроскопия исследуемого материала

Для обнаружения микроорганизмов используют разные виды микроскопии:

- световую;
- фазово-контрастную;
- темнопольную;
- люминесцентную.

Для *световой микроскопии* используют монокулярный микроскоп Минимед – 501. Микроскоп имеет увеличение окуляра 10х и четыре объектива с увеличением 4х, 10х, 40х, 100х. Объектив 100х называют иммерсионный, предназначен для микроскопии фиксированных, окрашен-

ных препаратов с использованием иммерсионного масла. Кратность увеличения составляет 1000 раз.

Для исследования живых микроорганизмов готовят препараты раздавленная или висячая капля, используют *фазово-контрастную и темнопольную микроскопию*.

Этапы приготовления мазка

Мазок – окрашенный препарат из убитых микроорганизмов, приготовленный на предметном стекле. Готовят мазки по этапам:

1. Приготовление мазка включает нанесение исследуемого материала на предметное стекло.

2. Высушивание при комнатной температуре.

3. Фиксация - умертвление микроорганизмов, проводят несколькими способами:

- нагревая над пламенем спиртовки,
- погружая в этиловый спирт на 10 -15 мин;
- погружая в смесь этилового спирта и этилового эфира на 10 -15 мин; -

- выдерживая в ацетоне 5 мин;

- выдерживая в метиловом спирте 2-3 мин.

4. Окрашивание выполняют, используя анилиновые краски: карболовый фуксин Пфейфера в течение 1 -2мин, метиленовый синий при экспозиции 5 -10 мин.

Существует простой метод окрашивания, когда используют только красители выявляют особенности морфологии микроорганизмов и сложные методы, когда устанавливают особенности химического состава бактерий, выявляют отдельные бактериальные структуры.

Способность микроорганизмов окрашиваться называют тинкториальными свойствами.

Бактериоскопическое исследование включает приготовление мазка и его микроскопирование, в результате обнаруживают микроорганизмы.

Характеристика палочковидных бактерий

Бактерии – одноклеточные организмы растительного происхождения, но лишённые хлорофилла, размножающиеся простым делением. Составляют царство Procariotae (прокариоты) в составе которого четыре отдела Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes, Mendosicutes. По форме бактерии подразделяют на палочковидные, шаровидные, извитые. К царству Procariotae относят также риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицеты.

Палочковидные бактерии самая многочисленная группа прокариот. Имеют цилиндрическую форму и осевую симметрию. Палочковидных бактерий называют от латинского bacterium – палочка.

Большинство бактерий располагается по одиночке, если они располагаются парами, называют *диплобактериями*, если цепочками – *стрептобактериями*.

Палочковидных тонких, слегка извилистых называют *микобактериями*, среди них сапрофиты и возбудители туберкулеза.

Прямые или изогнутые палочки с утолщениями на концах - *коринобактерии* (от греч. koryne, булова), среди них сапрофиты и возбудитель дифтерии человека.

Длинные, толстые палочки с заостренными концами – *фузобактерии*, они сапрофиты и один возбудитель некробактериоза животных Fusobacterium necrophorum.

Палочковидных, образующих споры, называют *бациллами* (Bacillus, Bac.). Споры – структуры, формирующиеся при неблагоприятных для бацилл условиях. Спора содержит геном, окруженный мощной оболочкой, выдерживающей высокие температуры. За счет мощной оболочки споры могут храниться в окружающей среде десятки лет. По форме споры могут быть овальные, цилиндрические.

Бациллы могут располагаться по одиночке, парами (диплобациллы), цепочками (стрептобациллы). Среди бацилл есть возбудители, полезные, много условно патогенных.

Палочковидных, образующие споры на концах клеток, с диаметром превышающим толщину клетки, называют клостридии (*Clostridium*, Cl.), располагаются одиночно.

Морфология кокков

Кокки от греч. *kokkos* – ягода, имеют шаровидную форму. Составляют три таксономические группы: грамположительные, грамотрицательные и грамотрицательные с коккобациллами.

Грамположительные относят к отделу Firmicutes в составе которого три семейства: Micrococaceae, Streptococaceae, Peptococaceae и самостоятельные роды.

По расположению клеток друг относительно друга грамположительные кокки подразделяют на микрококки, стрептококки, стафилококки, тетракокки и сарцины.

Микрококки имеют сферическую форму, располагаются по одиночке. Составляют род семейства Micrococaceae, обитатели почвы, пресных вод, типовой вид *Micrococcus luteus*.

Диплококки располагаются парами. У человека циркулируют возбудители из рода *Neisseria*, названного в честь А Нейссера – первооткрывателя гонореи, в составе рода *N.gonorrhoeae* и *N.meningitidis* – возбудитель менингококковой инфекции, протекающей с рождением носоглотки с последующей септициемией или менингитом.

Стрептококки составляют род *Streptococcus* семейства Streptococaceae, имеют сферическую форму, располагаются цепочками. Известно 20 видов, среди них сапрофиты - обитатели кожи, полезные - продуценты молочнокислого брожения и возбудители. Виды подразделяют по классификации Р. Лэнсфилд (1933) на 17 серогрупп и обозначают заглавными латинскими буквами от А до О. Широко известны 5 возбудителей болезней животных.

Таблица 1 - Виды патологии и морфология патогенных стрептококков

| Признаки | Название возбудителей, серогруппы | | | | |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | Str. pyogenes | Str. agalactia | Str. pneumonia | Str. equi | Str. faecalis |
| Патология | Пиодермии, пневмонии, холициститы у молодняка и взрослых | Серозный и катаральный мастит у коров | Стрептококкоз молодняка | Мыт жеребят | Энтерококковая инфекция поросят |
| Морфологические свойства | Мелкие, сферической формы, цепочками | Мелкие, сферической формы, цепочками | Мелкие, имеют форму треугольников, парами | Крупные, овальной формы, длинные цепи | Мелкие, сферической формы, цепочками |

Стафилококки имеют сферическую форму, располагаются гроздьями (от греч. Staphyle виноградная гроздь, относятся к семейству Micrococcaceae и роду Staphylococcus, В составе рода три вида St. aureus, St. saprophyticus, St. epidermidis).

St. saprophyticus – сапрофит, обитатель кожи человека и животных, St. epidermidis – условно патогенный. St. aureus - возбудитель 120 клинических форм стафилококковой инфекции у человека и животных. Клинически стафилококковая инфекция может проявляться заболеваниями трех групп:

- местным первично-гнойным воспалением кожи и мягких тканей, к которым относят образование фурункулов, карбункулов, абсцессов, флегмон и нагноением ран;
- системная стафилококковая инфекция проявляется пневмонией, маститом, отитом, холициститом;

▪ генерализованная – клинически проявляется стафилококковым сепсисом, протекает тяжело на фоне инфекционно-токсического шока (ИТШ).

У молодняка животных стафилококковая инфекция протекает генерализованно, а заболевание называют стафилококкоз.

К грамположительным коккам относят *тетракокки* – представителей семейства Peptococcaceae, имеют сферическую форму располагаются по четыре, составляют род. Все тетракокки сапрофиты.

Сарцины – крупные, сферической формы клетки, образующие скопления в нескольких плоскостях, сапрофиты, обитатели почвы, кишечника, всегда присутствуют в воздухе. Сарцины объединены в род семейства Peptococcaceae.

Характеристика извитых

К извитым относят представителей отдела Gracilicutes, порядка Spirochaetales, семейств Spirochaetaceae, Leptospiraceae, Spirillaceae, Vibrionaceae. В составе семейств множество родов.

К семейству Spirochaetaceae относят род *спирохеты* – крупные спирали с большим количеством завитков, представители этого рода сапрофиты - обитатели грязных водоемов, сточных вод.

К роду *кристиспира* (Cristispira) относят мелкие спирали с большим количеством завитков, комменсалы моллюсков.

Представители рода Treponema мелкие спирали с большим количеством завитков, типовой вид Treponema pallidum – возбудитель сифилиса человека, Treponema hyodysenteriae возбудитель анаэробной дизентерии поросят

К роду Borrelia, представители которого спирали, имеющие от 3 до 10 неправильных крупных завитков.

Представители этого рода возбудители: *Borrelia recurrentis* – возбудитель сыпного тифа человека; *Borrelia anserine* – боррелиоза птиц.

*Лептоспир*ы – мелкие вогнутые или изогнутые спирали, с завитками-крючками на концах составляют семейство Leptospiraceae, в его составе один род *Leptospira* и два вида *Leptospira biflexa* - сапрофит и *Leptospira interrogans* – возбудитель лептоспироза животных человека, представлен 183 серовариантами, объединенных в 25 серогрупп, имеющих название.

К семейству Spirillacea относят род *Campylobacter*. Выделено и описано 15 видов и 15 подвидов *кампилобактерий* (греч. *campylos* – изогнутый) - полиморфных изогнутых палочек в виде запятой или летящей чайки. Среди видов сапрофиты и возбудители: *Campylobacter fetus venerslis* (подвид)-возбудитель кампилобактериоза крупного рогатого скота, *Campylobacter fetus fetus* - кампилобактериоза мелкого рогатого скота, *Campylobacter jejuni* - кампилобактериоз птиц и человека.

К извитым относят *вибрионы* представителей семейства Vibrionaceae – мелкие изогнутые палочки в виде запятой. Типовой вид *Vibrio cholerae* – возбудитель холеры человека, среди вибрионов много сапрофитов.

Вопросы для обсуждения

1. Классификация микроорганизмов.
2. Этапы приготовления мазка.
3. Характеристика палочковидных.
4. Характеристика кокков.
5. Характеристика извитых.

ТЕМА 2

Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов.

Структура бактериальной клетки

Цель занятия. Познакомиться с характеристикой и морфологией риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов. Разобрать структуру бактериальной клетки.

Оборудование и материалы. Рабочие места бактериологов, взвеси риккетсий и актиномицетов. Электронный ресурс, таблицы «Морфология микроорганизмов».

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести бактериоскопию взвесей риккетсий, актиномицетов, результат зарисовать. Зарисовать морфологию хламидий и микоплазм.

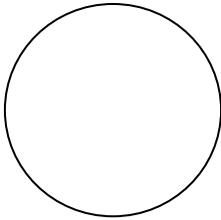


Рис. 3

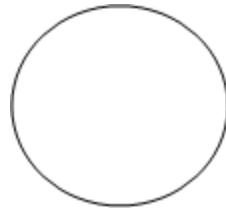


Рис. 4

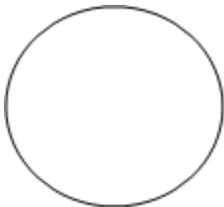


Рис. 5

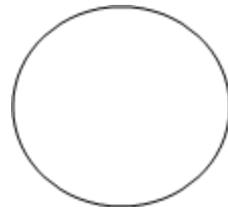


Рис. 6

Характеристика риккетсий

Риккетсии – мелкие, полиморфные палочки, внутриклеточные паразиты, названы в честь американского ученого Х. Риккетса, который впервые выделил возбудителя пятнистой лихорадки Скалистых гор в 1909 году.

Риккетсии составляют порядок *Rickettsiales*, в его составе три семейства. У животных и человека заболевания вызывают представители семейства *Rickettsiaceae*, включающее 8 родов.

По форме большинство риккетсий коккоподобные мелкие палочки, редко нитевидные формы, имеют примитивное строение, геном представлен смесью ДНК и РНК. Циркулируют у насекомых, после нападения которых возникают заболевания риккетсиозы., распространены во всех странах мира.

Наиболее известные возбудители:

- *Rickettsia prowazekii* – возбудитель сыпного тифа человека и его эндогенного рецидива болезни Бриля;
- *Rickettsia typhi* - эндемического (крысиного) сыпного тифа;
- *Coxiella burneti* – возбудитель Ку-лихорадки (Ку-риккетсиоза) крупного, мелкого рогатого скота, человека. Коксиеллы в отличие от других риккетсий могут длительно находиться в окружающей среде, устойчивы к высыханию и высокой температуре, так пастеризация молока не убивает риккетсий.

Человек Ку-лихорадкой заражается от больных, инфицированных продуктов животноводства, от укусов клещей. Ведущий способ заражения животных – трансмиссивный, через укусы инфицированных клещей.

Характеристика хламидий

Мелкие кокковидные, внутриклеточные паразиты, имеющие особый цикл размножения. За пределами клетки

образуют элементарные тельца, атакующие клетки, а внутри клетки – ретикулярные, разрушающие ее. Геном хламидий представлен смесью ДНК и РНК, имеют клеточную стенку и рибосомы.

Хламидии объединены в семейство *Chlamidiaceae*, состоящее из двух родов *Chlamidia* и *Chlamydoiphila*.

К роду *Chlamidia* относят:

- *C. trachomatis* - возбудителя трахомы человека;
- *C. suis* – возбудителя хламидиоза свиней;
- *C. muridarum* циркулирует у хомяков и мышей;

К роду *Chlamydoiphila* относят:

- *C. pneumoniae*- возбудитель пневмонии у человека и лошади;
- *C. pecorum*, *C. abortus* – возбудитель хламидиоза крс, мрс, свиней;
- *C. psittaci* – возбудитель орнитоза птиц и человека;
- *C. felis* – возбудитель хламидиоза кошек.

Характеристика микоплазм

Микоплазмы – свободноживущие, мелкие прокариоты, лишенные клеточной стенки и неспособные синтезировать ее компоненты. Клеточную стенку заменяет трехслойная клеточная мембрана, обеспечивающая осмотическую резистентность клеток. Характеризуются полиморфизмом и образуют кокковидные, нитевидные, колбовидные формы.

Микоплазмы относят к отделу *Tenericutes*, классу *Mollicutes*, семейству *Mycoplasmataceae*, роду *Mycoplasma*. В составе рода 64 вида, среди которых сапрофиты и возбудители.

Таблица 2 - Микоплазмы, патогенные для животных

| Признаки | Название возбудителей | | |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| | <i>M. mycoides</i> | <i>M. agalactia</i> | <i>M. gallisepticum</i> |
| Автор и дата открытия | Нокар, Ру, 1893 | Данатъен, 1923 | Нельсон, 1936 |

Продолжение таблицы 2

| | | | |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Название заболевания, клинические признаки | Перипневмония крупного рогатого скота (ПВЛ), экссудативная плевропневмония | Агалактия коз (мертвоорожденные, септицемия, мастит, у козлят септицемия, синовит, артрит) | Респираторный микоплазмоз у молодняка индеек, кур (фибринозный аэросаккулит) |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|

В патологии человека *M.pneumonia* вызывает атипичную пневмонию, *M.hominis*, *M.urealyticum* – уrogenитальный микоплазмоз.

Характеристика актиномицетов

Актиномицеты крупные палочковидные клетки, способные к ветвлению и формированию сплетений, напоминающих мицелий грибов.

Относят актиномицеты к порядку *Actinomycetales*, В составе которого семейства: *Actinomycetaceae*, *Streptomycetaceae*, *Nocardiaceae*.

Актиномицеты обитатели почвы, многие виды продуценты антибиотиков: *Streptomyces micromonospora* – стрептомицина; *Actinomyces fradiae* - неомицина; *Actinomyces arofaciens* – хлортетрациклина; *Actinomyces rimosus* – окситетрациклина; *Actinomyces venesuella* – хлорамфеникола.

Среди актиномицетов есть один возбудитель *Actinomyces bovis*, вызывает актиномикоз крупного рогатого скота с поражением слизистой рта, подкожной клетчатки, мышц, костей. Образующаяся гранулома развивается на нижней челюсти преимущественно у крупного рогатого скота и может метастазировать во внутренние органы.

Семейство *Actinomycetaceae* включает род *Bifidobacterium*, в составе которого 24 вида бифидобактерий – обязательных обитателей слизистой толстого отдела кишечника, формирующих биопленку на поверхности слизистой,

обеспечивающих колонизационную резистентность – защиту организма от возбудителей, гнилостных бацилл, способствующих всасыванию питательных веществ, макро-, микроэлементов.

Структура бактериальной клетки

Изучение структуры микроорганизмов стало возможным после внедрения в лабораторную практику электронной микроскопии с большой разрешающей способностью, что позволило выявить различные структуры, изучить их функции.

Один из основных признаков прокариотической клетки – отсутствие внутреннего деления, обеспечиваемого элементарными мембранами. У бактерий установлены поверхностные и глубокие структуры. К поверхностным относят капсулу, жгутики, микроворсинки, клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану.

- *Капсула* - образование чаще углеводной природы для защиты клетки от механических повреждений, высыхания, проникновения фагов, токсических веществ, а у возбудителей - от фагоцитоза. Капсула не является жизненно необходимой для бактерий, ее повреждение не приводит к гибели клетки. Есть бактерии содержащие капсулу, но многие не содержат капсулу.

- *Жгутики* – полые выросты из сократимого белка флагеллина, органы движения плавающих бактерий. По расположению и количеству жгутиков известны такие бактерии как перитрихи, поверхность которых покрыты жгутиками. Монотрихи имеют один жгутик. Лофотрихи имеют пучок жгутиков на одном полюсе клетки. Амфитрихи – по одному или несколько жгутиков, расположенных би-полярно.

- *Ворсинки* – тонкие волоски, количество которых от 10 до нескольких тысяч. Известны ворсинки двух типов:

- *фимбрии*, покрывающие поверхность клетки, предназначенные для прикрепления бактерий к субстрату;

- *F-пили* – жесткие цилиндрические образования, участвующие в конъюгации бактерий.

▪ *Клеточная стенка* – тонкое, эластичное, прочное образование, главный компонент которой пептидогликан (муреин). В состав клеточной стенки грибов входит хитин. Клеточная стенка выполняет защитную функцию, придает форму клетки, участвует в транспорте питательных веществ и выделении метаболитов, повреждение клеточной стенки приводит к гибели бактерий. Некоторые бактерии на поверхности клеточной стенки имеют мембранный слой из сплетений волокон декстраны и леваны – гликокаликс, обеспечивающий прикрепление бактерий к субстрату. Существуют бактерии, лишенные клеточной стенки: сферопласты, протопласты, L – формы.

Сферопласты – формы бактерий, частично лишенные клеточной стенки под действием лизоцима, антибиотиков.

Протопласты – формы, полностью лишенные клеточной стенки.

L – формы – бактерии, дефективные по клеточной стенке, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан. L – формы образуются из обычных бактерий под воздействием антибиотиков, аминокислот, ферментов, ультрафиолетовых и рентгеновых лучей. L – формы очень жизнеспособны, активно размножаются.

▪ *Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)* – пластичное, сетчатое образование из двух слоев липидов и встроенных в липидную мембрану белковых молекул. ЦПМ – орган обмена веществ у бактерий. Играет роль осмотического барьера, контролирующего поступление и выход различных веществ из клетки. ЦПМ отвечает за синтез капсулы и клеточной стенки, к ней прикреплены жгутики и ворсинки.

К глубоким структурам относят: мезосомы, нуклеоид, плазмиды, рибосомы, лизосомы, включения. Полость клетки заполнена коллоидной массой – цитоплазмой.

- *Мезосомы* – трубчатые образования, инвагинаты (впячивания) ЦПМ, содержат ферменты переноса электронов и окислительного фосфорилирования. В мезосомах идет синтез энергетических соединений.

- *Нуклеоид* (генофор, бактериальная хромосома) содержит двунитчатую спиральную, закольцованную ДНК, организованную в одну хромосому.

- *Плазмиды* – включения дополнительной ДНК, кодирующей специфические свойства бактерий, такие как устойчивость к противомикробным препаратам. Плазмиды обнаруживают у некоторых видов бактерий (кишечной палочки, сальмонеллы).

- *Рибосомы* – гранулы, место синтеза бактериального белка, содержат РНК и белки. В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5000 до 50000 рибосом.

- *Лизосомы* – места скопления ферментов, участвующих в метаболизме клетки.

- *Включения* – запасные питательные вещества или избыток метаболитов. В виде гранул могут накапливаться жиры, полисахариды, воска, полимеры оксимасляной кислоты, полифосфаты, сера, кристаллизованные, токсичные белки.

Некоторые структуры бактерий были обнаружены с помощью сложных методов окрашивания.

Вопросы для обсуждения

1. Характеристика грибов.
2. Характеристика риккетсий и микоплазм.
3. Характеристика актиномицетов, хламидий.
4. Структура бактериальной клетки.

ТЕМА 3

Сложные методы окрашивания. Питательные среды. Выделение чистых культур аэробов

Цель занятия. Познакомиться со сложными методами окрашивания, образцами концентратов и готовых питательных сред, методами посевов материала на питательные среды. Разобрать структуру бактериальной клетки.

Оборудование и материалы. Рабочие места бактериологов, «смыв из раны», образцы основных, элективных, дифференциально-диагностических питательных сред готовых и концентратов. Питательные среды для посева исследуемого материала в чашках Петри Электронный ресурс, таблицы «Питательные среды»

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести бактериоскопию исследуемого материала по Граму, результат зарисовать. 2. Освоить методику приготовления питательных сред из концентратов. 3. Познакомиться с ассортиментом питательных сред разного назначения. 4. Освоить методику посева исследуемого материала «штрихами» и выполнить работу первого дня по выделению чистых культур аэробов.

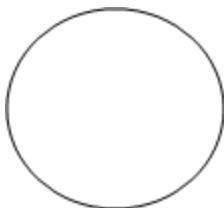


Рис. 7

Сложные методы окрашивания бактерий

С помощью сложных методов окрашивания обнаруживают отдельные структуры бактерий, особенности их химического состава, что необходимо для определения их вида.

К сложным методам окрашивания относят:

- Метод Грама, выявляет особенности химического состава бактерий.

- Метод Циля – Нильсена, для окрашивания кислото-, спиртоустойчивых бактерий, таких как возбудители туберкулеза, паратуберкулеза, проказы.

- Метод Нейссера для выявления включений, используют для обнаружения возбудителя дифтерии.

- Метод Гинса для обнаружения капсул.

- Метод Ауески или Ожешко для обнаружения спор.

- Метод Леффлера для обнаружения жгутиков у крупных бактерий.

- Метод Пешкова для окрашивания клеточной стенки.

- Метод Романовского – Гимза для окрашивания нуклеоида, применяют также для окрашивания клеток крови, хламидий, риккетсий.

Перечисленные классические методы окрашивания структур микроорганизмов являются ведущими. Известны и современные сложные методы окрашивания:

- окраска акридиновым оранжевым для кислото- и спиртоустойчивых бактерий;

- окраска спор по Пешкову;

- выявление капсул по Рибегеру;

- окраска жгутиков по Грею, Петруку;

- окраска включений по Рискиной;

- выявление клеточной стенки по методу Кнази.

Сущность окраски по Граму

Бактерии, которые окрашиваются по Граму подразделяют на грамположительные (фиолетовые) и грамотрицательные (розовые).

Грамположительные бактерии имеют трехслойную клеточную стенку с большим количеством муреина, они прочно взаимодействуют с краской генцианвиолетом, рН

цитоплазмы слабо кислый, хорошо адсорбирующий анионы иода, что укрепляет комплекс краски. Под действием спирта они не обесцвечиваются и сохраняют фиолетовое окрашивание.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий двухслойная, белковая, слабо воспринимающая окрашивание. рН цитоплазмы – нейтральный, анионы иода не адсорбируются и комплекс краски не укрепляется. Под воздействием спирта он разрушается, бактерии обесцвечиваются, необходимо докрасивание фуксином в розовый цвет.

Техника окраски по Граму

- На фиксированный мазок наносят краску генцианвиолет на 2 мин.
- Краску сливают, наносят раствор Люголя на 1 мин.
- Сливают раствор Люголя и наносят этиловый спирт на 30 сек.
- Отмывают мазок водой.
- Наносят фуксин Пфейфера на 2 мин.
- Отмывают мазок водой, высушивают, промокая фильтровальной бумагой.

Питательные среды

Питательные среды – это субстраты для выращивания бактерий. Они должны быть:

- Полноценными по питательному составу, содержать вещества в легкоусвояемой форме.
- Изотоничными, содержать не более 1-0,9% солей.
- Иметь оптимальный рН, чаще нейтральный 7,0 – 7,2.
- Иметь оптимальный окислительно-восстановительный потенциал (eh).
- Должны быть стерильными и прозрачными.

Питательные среды готовят:

- из продуктов животного происхождения: мясо говядины, молоко, яйца, сыворотка крови;
- из продуктов растительного происхождения: картофель, морковь, кукурузный экстракт;
- синтетические, состоят из химически чистых соединений.

Классификация питательных сред

В зависимости от целей применения среды подразделяют на:

- *общего назначения* – для выращивания разных видов бактерий;
- *элективные* – для выращивания отдельных видов прихотливых бактерий;
- *дифференциально-диагностические* – для выращивания и распознавания вида бактерий по характеру роста.

По консистенции питательные среды подразделяют на жидкие, полужидкие, плотные.

К средам общего назначения относят:

- мясопептонный бульон (МПБ), в его составе мясная вода, 1% пептона и 0,5% хлорида натрия;
- мясопептонный агар (МПА), готовят, добавляя в горячий МПБ 2-3% агар-агара (безазотистое органическое вещество, получаемое из морских водорослей);
- питательный бульон (ПБ), готовят из концентрата на основе гидролизата белков рыбы;
- питательный агар (ПА), готовят из концентрата на основе гидролизата белков рыбы.
- питательная среда для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), готовят из концентрата на основе гидролизата молока, обогащенная автолизатом дрожжей и фосфатом калия (ТУ 9229-026-04610209-94)

Элективные среды (лат. electus –избранный) готовят

из основных, чаще используют МПА или ПА, добавляя 5-10% стерильной сыворотки крови (сывороточный агар), дефибринированной крови (кровяной агар), автолизат дрожжей, красители, углеводы, желчь (желчный агар). Элективные среды предназначены для выращивания прихотливых бактерий, которые не растут на средах общего назначения. Для приготовления элективных сред выпускают концентраты:

- солевой бульон;
- молочно-солевой агар;
- среда СДА для определения спор мезофильных анаэробных бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используют для выращивания и распознавания отдельных видов бактерий по характеру роста. Они включают:

- среды Гисса для изучения биохимических свойств бактерий, готовят из концентрата, содержат индикатор и при расщеплении углевода цвет среды изменяется, в толще столбика накапливаются пузырьки CO_2 ;
- среда Эндо для распознавания роста кишечной палочки и сальмонелл, готовят из концентрата;
- среда Левина для тех же целей;
- висмут-сульфит агар для тех же целей;
- среда Клингерта для выявления способности бактерий расщеплять глюкозу, лактозу, образовывать сероводород;
- Симмонс агар для распознавания роста кишечной палочки и сальмонелл;
- среда Кода для выявления лактозоположительных микроорганизмов (кишечной палочки);
- среда Китт-Тароцци для выращивания анаэробов, в ее составе смесь печеночной воды и МПБ 2:1 с кусочками отварной печени и вазелиновым маслом на поверхности;
- среда RCM (улучшенный клостридиальный бульон) готовят из концентрата;

- дифференциальный улучшенный клостридиальный бульон (DRCM), предназначена для учета клостридий в пищевых продуктах и других материалах, готовят из концентрата;
- улучшенный клостридиальный бульон (RCM), готовят из концентрата;
- среда Сабуро для выращивания грибов, готовят из концентрата;
- среда Чапека для выращивания грибов, готовят из концентрата;
- кукурузно-лактозная среда для выращивания бифидобактерий и пропионовокислых бактерий.

Культивирование микроорганизмов

Культивирование – это выращивание бактерий на питательных средах.

Выращивание больших объемов бактерий на жидких или полужидких средах в биореакторах называют *глубинным культивированием*.

Для культивирования необходимы условия:

- оптимальная температура: для большинства микроорганизмов 37° , для лептоспир $28-30^{\circ}$, грибов $26-28^{\circ}$;
- оптимальный pH, для большинства $7,0 - 7,2$, при глубинном культивировании его корректируют;
- оптимальный окислительно-восстановительный потенциал: для аэробных микроорганизмов приток стерильного кислорода, для анаэробных - вакуум.

В лабораторных условиях культивирование проходит при оптимальной постоянной температуре, а для анаэробов еще и в бескислородных условиях.

Глубинное культивирование проводят в биореакторах, при соблюдении всех параметров, поэтому оно более результативное, накопление бактерий в несколько раз больше, чем в лабораторных условиях. Глубинное культи-

вирование можно проводить как периодический процесс и по типу непрерывного, проточного.

Чистая культура - популяция бактерий одного вида, выращенная на питательной среде.

Культуры, полученные в результате размножения нескольких видов бактерий, называют *смешанными*, исследованию не подлежат и уничтожаются.

Штамм – культура имеющая четкие видовые свойства и биологические особенности.

Клон – культура, выращенная из одной бактериальной клетки.

Посев – внесение исследуемого материала в питательную среду. Существует несколько способов посева:

- способом Дригальского – штрихами по поверхности питательной среды в чашке Петри;

- глубинный, когда в чашку Петри вносят исследуемый материал, затем заливают расплавленной, а затем охлажденной до 40⁰ питательной средой;

- уколом, пользуясь бактериологической петлей или пипеткой сеют на полужидкие среды или на плотные, но расплавленные и охлажденные;

- смешиванием исследуемого материала с жидкой питательной средой с помощью бактериологической петли или пипетки;

- зигзагом сеют на плотные среды в пробирках с помощью бактериологической петли;

- газоном сеют на плотные среды в чашки Петри, равномерно распределяя бульонную культуру по поверхности, избыток удаляют;

- по Шукевичу, когда исследуемый материал помещают в конденсат плотной питательной среды в пробирке, применяют для подвижных бактерий.

Изучение питательных сред, условий культивирования необходимы для осваивания самого точного метода микро-

биологических исследований - бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает выделение микроорганизмов из среды их обитания, получение чистой культуры и ее идентификацию (определение вида).

Первая задача бактериологического исследования – выделение чистой культуры. Аэробные микроорганизмы выделяют в три этапа.

Этапы выделения чистых культур аэробов

Первый день: 1. Бактериоскопия по Граму или ориентировочным методом исследуемого материала, проводят не всегда.

2. Посев исследуемого материала на плотные среды.

Второй день: 1. Изучают характер роста и отмечают «типичные колонии».

2. Проводят бактериоскопию «типичных колоний».

3. Посев «типичных колоний» на жидкие и плотные среды в пробирках.

Третий день: 1. Просматривают агаровые культуры, если рост однородный – культуры чистые.

2. Проводят бактериоскопию бульонных культур, если в мазках одинаковые микроорганизмы – культуры чистые, приступают к идентификации.

Вопросы для обсуждения

1. Программированный контроль по разделу «Морфология и структура микроорганизмов».

ТЕМА 4

Культуральные свойства микроорганизмов. Фазы роста микроорганизмов. Работа второго дня по выделению чистых культур аэробов. Методы идентификации. Выделение чистых культур анаэробов

Цель занятия. Программированный контроль по разделу «Морфология и структура микробов». Познакомиться с методикой изучения культуральных свойств микроорганизмов. Разобрать фазы роста микроорганизмов, методы идентификации, методы выделения чистых культур анаэробов.

Оборудование и материалы. Рабочие места бактериологов, посеvy исследуемого материала, посеvy разных микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах, посеvy микроорганизмов на дифференциально – диагностических питательных средах. Анаэроустат, среды для выращивания анаэробов. Электронный ресурс, таблицы «Культуральные, протеолитические, биохимические свойства микроорганизмов»

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Выполнить работу второго дня по выделению чистых культур аэробов, результат бактериоскопии зарисовать. 2. Представить характеристику выросших колоний и биологических свойств микробов.

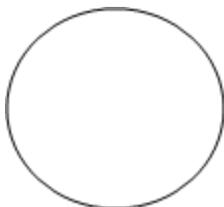


Рис. 8

Культуральные свойства микроорганизмов

Культуральными свойствами называют особенности роста микроорганизмов на питательных средах. На плотных питательных средах микроорганизмы образуют колонии – видимые скопления микроорганизмов. Культуры, выращенные на плотных средах, называют *агаровыми*. Неподвижные и малоподвижные микроорганизмы образуют изолированные колонии.

Колонии изучают, просматривая невооруженным глазом и с помощью лупы, характеризуют по признакам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 - Характеристика колоний

| Величина | Форма | Поверх | Рельеф | Консистенц | Структура | Прозрач | Пигмент | Запах | Край |
|--------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|------------------|
| крупные 4 мм. средние 2-4 мм. мелкие ≤ 2 мм | круглые, овалы, листовид | гладкая, складчат | плоский, выпукл. вдавлен | влажная, слизистая, сухая | Плотная, зернистая, ветвистая | прозрач, полуп-, розрач не прозрач. | есть, нет | есть, нет | S-формы, R-формы |
| | | | | | | | | | |

Подвижные микроорганизмы образуют колонии «с роением», т.е. растут в виде пленки. Их характеризуют по

таким признакам как поверхность, рельеф, консистенция, структура, прозрачность, пигмент, запах.

Культуры, выращенные на жидких средах, называют *бульонными*, у них изучают:

- поверхностный рост (пристеночное кольцо, пленка);
- интенсивность помутнения (слабое, умеренное, сильное, стойкое, проходящие);
- характер осадка (плотный, зернистый, хлопьевидный, в виде комка ваты);
- количество осадка (обильное, скудное).

Пигментообразующие микроорганизмы вызывают окрашивание питательной среды и осадка.

Фазы роста микроорганизмов

Под ростом микроорганизмов понимают необратимое увеличение числа клеток.

Рост микроорганизмов после посева в питательную среду происходит по фазам:

- *лаг-фаза* (задержки роста), в этот период микроорганизмы адаптируются к новым условиям. Продолжительность этой фазы различная и зависит от состава питательной среды, видом микроорганизма, заканчивается с началом размножения;

- *экспоненциальная фаза* (логарифмическая) характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Количество клеток удваивается в единицу времени. Скорость деления зависит от вида микроорганизмов, так *E.coli* делится каждые 20 мин, а нитробактерии – через 5-10 час. В экспоненциальную фазу образуется огромное количество бактерий, происходит значительный расход субстрата, количества O_2 , накапливаются токсические метаболиты, скорость генерации (*generation* лат. размножение) снижается, появляются погибшие клетки;

- *стационарная фаза* характеризуется равновесием

ем между генерацией и гибелью. Количество биомассы, полученное в стационарную фазу называют *выходом или урожаем*. В конце этой фазы гибель клеток усиливается;

- *фаза отмирания* характеризуется экспоненциальной гибелью клеток (автолизом). В живых также остается много клеток, но только тех, которые находятся в покое и характеризуются стабильными биологическими свойствами.

Рост для большинства микроорганизмов после посева заканчивается за 16 – 24 часа, есть исключения: возбудители туберкулеза растут 3 недели, бруцеллеза 30 дней, паратуберкулеза – 7 месяцев.

Методы идентификации

Идентификация - определение вида микроорганизмов, проводят, изучая биологические свойства:

- *морфологические и тинкториальные*, бактериоскопией мазков, окрашенных по Граму или сложными методами;

- *культуральные свойства*, посевом на среды общего назначения, элективные, дифференциально-диагностические;

- *биохимические свойства* – способность расщеплять специфические углеводные субстраты, для этого делают посеvy на среды Гисса, среду Клигера, трехсахарный агар с мочевиной и другие. Изменение цвета свидетельствует о деятельности ферментных систем микроорганизмов, биохимические свойства можно изучать на приборе «Vites»;

- *протеолитические свойства* – способность расщеплять белковые субстраты, изучают посевом на МПБ или ПБ с индикаторными бумажками для выявления образования аммиака, сероводорода, индола. Посевом в МПЖ (мясо-пептонный желатин), чтобы установить возможность микроорганизмов послойно или полностью плавить субстрат, вызывать расплавление в виде воронки (возбудитель сибирской язвы), в виде «чулка» (золотистый стафилококк);

▪ *гемолитические свойства* – способность разрушать эритроциты за счет гемолизина, токсина белковой природы, для этого делают посев изучаемой культуры на МПА с 5% дефибринированной крови барана или кролика (кровяной агар). Различают три разновидности гемолиза:

- альфа-гемолиз, когда в эритроцитах под действием токсина идет превращение гемоглобина в метгемоглобин, а вокруг колоний образуется зона с зеленым или коричнево-зеленым цветом;

- бета-гемолиз характеризуется полным разрушением эритроцитов, вокруг колоний образуется прозрачная, бесцветная зона;

- дельта-гемолиз – разрушение эритроцитов человека, коровы, лошади и других животных;

▪ *антигенные свойства* – выявление специфических, для изучаемого микроорганизма, антигенных комплексов по результатам взаимодействия с диагностическими иммунными сыворотками. Антигенные свойства изучают с помощью серологических реакций;

▪ *вирулентные свойства* – болезнетворность выделенных культур по отношению к лабораторным животным, заражая лабораторных животных: белых мышей, морских свинок, кроликов взвесью агаровых, бульонных культур, фильтратов изучаемых микроорганизмов. Метод заражения лабораторных животных с целью выявления вирулентности возбудителя называют биопробой. Результат учитывают, определяя Dlm (*dosis letalis minima*) – наименьшей дозы, которая убивает 100% подопытных животных. В настоящее время возникают затруднения в определении этого показателя, поэтому оценку вирулентности проводят по LD₅₀ – дозе живых микробных клеток в 1мл исследуемого материала (КОЕ/мл), вызывающей гибель 50% подопытных животных;

▪ *генетическую специфичность* ДНК микроорганиз-

мов с помощью ПЦР, для идентификации с помощью ПЦР можно использовать не только чистые культуры, но и субстраты обитания микроорганизмов, содержащие разные виды микробов.

Идентификацию по биохимической и протеолитической активности микоорганизмов проводят автоматизировано:

- с помощью микротест - систем на приборе Vites;
- с помощью планшетов для прибора микро Такса;
- используя наборы тест – систем API 20TM –учет визуальный.

Этапы выделения чистых культур анаэробов

Анаэробы - микроорганизмы, активно размножающиеся в бескислородных условиях, без доступа воздуха.

Выделение чистых культур анаэробов имеет особенности, проводят в течение четырех дней.

Первый день: 1. Посев исследуемого материала на среду Китт-Тароцци или на среду RCM в пробирки. Среды предварительно должны быть выдержаны на кипящей водяной бане в течение 30 мин, для удаления кислорода.

Второй день: 1. Бактериоскопия выращенной культуры, если в мазках крупные палочки, исследования продолжают.

2. Посев культуры, выросшей на средах Китт-Тароцци или RCM по Цейсслеру на три чашки с кровяным, сахарным агаром (МПА с 5% крови и 1% глюкозы). Посев выполняют бактериологической петлей штрихами, ставят в анаэрогат, откачивают воздух, потом в термостат. Можно сделать посев по Вейнбергу на три столбика с сахарным агаром, предварительно агар в столбиках выдерживают на кипящей водяной бане 30 мин, затем охлаждают до 37-40⁰ С. Столбики после посева ставят в термостат.

Третий день: 1. Изучают характер роста, отмечают «типичные колонии».

2. Проводят бактериоскопию «типичных колоний», если морфологические свойства соответствуют предполагаемым микроорганизмам, исследования продолжают.

3. Посев «типичных колоний» на среду Китт-Тароцци или на среду RCM.

Четвертый день: 1. Бактериоскопия выросшей культуры, если в мазках одинаковые клетки – культура чистая, приступают к определению ее вида, идентификации. Идентификацию анаэробных микроорганизмов проводят по тем же свойствам, как и аэробных. Важное значение имеет результат биопробы.

Если для выделения анаэробов используют улучшенный клостридиальный бульон (RCM), то после посева добавляют стерильное парафиновое масло и пастеризуют 30 мин при 75⁰ С на водяной бане. Инкубируют посева не менее 7 дней при 30⁰. Если обнаруживают черное окрашивание, проводят идентификацию.

Вопросы для обсуждения

1. Коллоквиум №1 по разделу «Общая микробиология».

Вопросы коллоквиума 1

1. Систематика микроорганизмов.
2. Систематика грибов.
3. Характеристика грибов и микозов.
4. Этапы приготовления мазка.
5. Характеристика палочковидных.
6. Разновидности кокков.
7. Характеристика извитых.
8. Характеристика риккетсий.
9. Характеристика хламидий.
10. Характеристика микоплазм.
11. L –формы бактерий, прото-, сферопласты.

12. Характеристика актиномицетов.
13. Структура бактериальной клетки.
14. Сложные методы окрашивания.
15. Техника и сущность окраски по Граму.
16. Способы размножения микроорганизмов.
17. Проницаемость и транспорт питательных веществ в клетки микроорганизмов.
18. Химический состав бактериальной клетки.
19. Типы питания бактерий.
20. Токсины микроорганизмов.
22. Питательные среды.
22. Культивирование бактерий, определения: чистая культура, смешанная культура, штамм, клон.
23. Типы дыхания бактерий.
24. Спиртовое и молочнокислое брожения.
25. Пропионовокислое, маслянокислое и ацетонобутиловое брожения.
26. Культуральные свойства бактерий.
27. Фазы роста микроорганизмов.
28. Выделение чистых культур аэробов.
29. Методы идентификации.
30. Выделение чистых культур анаэробов.
31. Мутации у микроорганизмов.
32. Рекомбинации у микроорганизмов.

ТЕМА 5

Методы стерилизации. Химические противомикробные препараты. Методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП и фагам

Цель занятия. Коллоквиум по разделу «Общая микробиология». Разобрать методы стерилизации, познакомиться с оборудованием для стерилизации. Разобрать и познакомиться с образцами химических противомикробных препаратов.

Разобрать и освоить методы определения микроорганизмов к антибиотикам, их распределения по группам на основе химической структуры и клинического применения. Познакомиться с методами определения чувствительности возбудителей к фагам.

Оборудование и материалы. Оборудование и инструменты для стерилизации. Образцы химических противомикробных препаратов.

Образцы антибиотиков и бактериофагов. Посевы ДДМ готовые к учету, Посев по методу серийных разведений, готовый к учету, чашки со средой АГВ, стерильные пипетки, бульонная культура, диски с антибиотиками. Образцы бактериофагов, посевы по методу Отто, Фюрта, Апельмана, Грация готовые к учету

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Познакомиться с оборудованием для стерилизации.
2. Познакомиться с химическими противомикробными препаратами и распределить представленные в таблице образцы по группам назначения.
3. Освоить постановку и учета метода ДДМ, распределить образцы антибиотикам по группам на основе химической структуры и клинического применения.
2. Познакомиться с образцами фагов и методами определения чувствительности возбудителей к бактериофагам.

Таблица 4 - Распределение препаратов по группам назначения

| Название препарата | Дезинфектант | Антисептики | Химиотерапевтические | | |
|-------------------------------|--------------|-------------|----------------------|-----------|---------|
| | | | сульфанилам | нитрофур. | хинолон |
| Хлорная известь | | | | | |
| Фуразолидон | | | | | |
| H ₂ O ₂ | | | | | |

Продолжение таблицы 4

| | | | | | |
|---------------------|--|--|--|--|--|
| Формалин | | | | | |
| Лизол | | | | | |
| ДП-2 | | | | | |
| Энрофлоксацин | | | | | |
| Офлоксацин | | | | | |
| Фурациллин | | | | | |
| Нифуроксазид | | | | | |
| Бисептол | | | | | |
| Биопаг | | | | | |
| Фенол | | | | | |
| Хлорамин | | | | | |
| Стрептоцид | | | | | |
| Норфлоксацин | | | | | |
| Надуксусная кислота | | | | | |

Физические методы стерилизации

Стерилизация (лат. sterilis – обеспложивание) – уничтожение всех форм микроорганизмов в материале.

Эффективность стерилизации во многом зависит от качества предстерилизационной обработки предметов и санитарного состояния помещения, где она осуществляется.

Предстерилизационная обработка посуды, инструментов включает следующие этапы:

- ополаскивание;
- замачивание в моющем растворе;
- мытье щеткой или ершиком;
- ополаскивание в проточной, водопроводной, а затем в дистиллированной воде;
- сушка.

Для стерилизации используют методы:

- *фломбирование* (прожигание) над пламенем спиртовки, предметы прокаливают до красна, применяют для бактериологической петли;
- *кипячение* в дистиллированной воде или 1-2%-ном

растворе гидрокарбоната натрия, не менее 45 мин, выполняют в стерилизаторах, применяют для шприцев, хирургических инструментов в ветеринарной практике;

- *сухим жаром* в сушильном шкафу при температуре 160⁰ С в течение 2 часов, при 170⁰ С – 1,5 часа, при 180⁰ С - 1 час, используют для посуды, хирургических инструментов, шприцев, открывают шкаф при 45⁰ С.

- *паром под давлением в автоклавах (паровых стерилизаторах)* - стерилизуют питательные среды общего назначения при 1,2 ат, что соответствует температуре 120-121⁰ С, в течение 20 мин; питательные среды, содержащие углеводы, гидролизаты при 0,9 ат и температуре 100 – 110⁰ С в течение 30 мин; посуду, шприцы, иглы, хирургические инструменты, перевязочный материал при 1,2 ат, что соответствует температуре 120-121⁰ С, в течение 45 мин. Шприцы, иглы, инструменты, перевязочный материал стерилизуют в стерилизационных коробках (биксах). Пипетки, чашки Петри заворачивают в бумагу, флаконы закрывают ватно-марлевыми пробками затем стерилизуют. Срок сохранения стерильных предметов в биксах 20 суток, в остальных упаковках - 3 суток. Режим 2 ат при температуре 134-136⁰ С используют для стерилизации мясных, рыбных консервов, режим 0,5 ат – 100⁰ С - для стерилизации растворов лекарств, овощных и фруктовых консервов. Для контроля работы автоклава применяют индикаторы;

- *текущим паром в аппарате Коха* при 100⁰ С в течение 30-40 мин и на протяжении трех – пяти дней стерилизуют питательные среды, соки, консервы для детского и диетического питания, с целью сохранения витаминов, ферментов, еще этот метод называют дробной стерилизацией;

- *тиндализацию* – дробная стерилизация при температуре 54 -56⁰ С (предложен метод в 1877 году Тиндалем), проводят на водяной бане в течение 6-7 дней, в первый день выдерживают 2 часа, в последующие дни по 30 мин –

1 часу. Тиндализацию используют для стерилизации кровезаменителей, иммунных сывороток, глобулинов, питательных сред;

- *фильтрацию* через бактериальные фильтры мембранные или глубинные, задерживающие микроорганизмы и их споры. Мембранные фильтры изготавливают из эфиров целлюлозы, тефлона, акрила, полимеров. Глубинные – из волокнистых материалов (хлопок, шерсть, стекловолокно, целлюлозы и асбеста). Фильтрованием стерилизуют сыворотки крови, глобулины кровезаменители, растворы витаминов, растворы термолабильных белков;

- *ультрафиолетовое облучение* для стерилизации воздуха в боксах, операционных, пробирок, изготовленных из термолабильных пластмасс, используют облучатели ОБН, экспозиция облучения 2 часа.

Пастеризация – уничтожение только вегетативных форм микроорганизмов, споры остаются живыми. Достигается однократным прогреванием при температуре $90 - 80^{\circ}\text{C}$. Применяют для молока, пива, столового вина, чтобы увеличить срок реализации, а в молоке уничтожить возбудителей туберкулеза, бруцеллеза.

Метод инаktivирования вегетативных форм микроорганизмов назван в честь Л. Пастера, предложившего в 1864 году нагревание вина до $60 - 70^{\circ}\text{C}$ для уничтожения вегетативных клеток бродильных микроорганизмов, сохраняя при этом вкусовые качества продукта.

Химические методы стерилизации

Рекомендуются для изделий из полимерных материалов, резины, стекла, коррозионностойких материалов. Применяют газы и растворы. Для газовой стерилизации применяют:

- окись этилена в дозе 1200 мг/дм^3 , температура стерилизации не менее 18°C , экспозиция – 16 час;

- смесь ОБ (смесь окиси этилена и бромистого метила в соотношении 1:2,5), в дозе 2000 мг/дм³, экспозиция 4 часа.

В связи с токсичностью окиси этилена и бромистого метила применение стерилизованных изделий допускается только после их дегазации, т.е. выдержки в вентилируемом помещении до допустимых остаточных количеств по НТД.

Для химической стерилизации растворами используют перекись водорода и надкислоты:

- 6%-ный раствор перекиси водорода в течение 6 часов;
- 1%-ный раствор дезоксона – 45 мин.

Химическую стерилизацию растворами проводят в закрытых емкостях из стекла, пластмассы при полном погружении в раствор на время стерилизации. После этого изделие должно быть промыто стерильной дистиллированной водой.

Радиационный метод стерилизации

Радиационный метод стерилизации используют для изделий из пластмасс, изделий одноразового использования в упаковке, перевязочных материалов, некоторых лекарственных средств.

Источники ионизирующего излучения дозой 25 кГр гамма-установки, ускорители электронов.

Химические противомикробные препараты

Известны многие вещества, полученные химическим синтезом с противомикробным действием, которое может быть бактериостатическим и бактерицидным. При бактериостатическом действии размножение микроорганизмов прекращается на период применения препарата, при бактерицидном – происходит гибель микроорганизмов от контакта с бактерицидным веществом.

В зависимости от целей применения противомикробные химические вещества подразделяют на три группы:

дезинфицирующие, антисептические и химиотерапевтические.

Дезинфицирующие - (франц. des- удаление, лат. infectio- заражение) *вещества*- ядовитые соединения для уничтожения возбудителя в окружающей среде. К ним относят препараты, содержащие галоиды, щелочи, кислоты, поверхностно-активные вещества, альдегиды и др.

- Действующим началом галоидосодержащих препаратов является анион OCl^- , HOCl (активный хлор), обладающий бактерицидным действием на широкий спектр микроорганизмов. Галоидосодержащие препараты включают:

- *хлорную известь*, содержащую 35 – 26% активного хлора, для дезинфекции применяют 2%-ные и большей концентрации растворы;

- *хлорамин Б и ХВ*, содержит 26- 28% активного хлора, применяют в виде не активированных 0,2 – 5% -ных растворов и активированных аммиаком и аммонийными солями 0,5 – 4%-ных растворов;

- *препарат ДТСГК* (двухтретьосновная соль гипохлорита кальция) содержит 47 – 55% активного хлора, применяют 0,2 – 10%-ных растворов;

- *препарат ДП - 2* (композиция на основе трихлоризоциануроновой кислоты) содержит 40% активного хлора, применяют 0,5 – 7%-ные растворы;

- актив-люкс (Д).

Для профилактической (при возможности наличия возбудителя) и текущей (обеззараживания объектов в окружении источника инфекции) дезинфекции применяют растворы щелочей:

- каустическую соду (гидроокись натрия или калия) применяют 2 – 10% -ные, горячие 70°C растворы.

К кислородосодержащим дезинфицирующим препаратам относят:

- перекись водорода 1 -6%-ные растворы;

- надкислоты, например надуксусную кислоту 0,1 – 1%-ные растворы, препараты, содержащие надуксусную кислоту «Дезоксон-1», «Дезоксон-4», применяют в виде 0,1 – 1%-ных растворов;

- биопаг, содержит перекись водорода, 1 -6%-ные рабочие растворы.

Фенолосодержащие препараты:

- фенол (карболовая кислота) в виде 3 -5%-ных растворов;

- лизол (раствор крезоло в калийном мыле) в виде 2%-ного раствора.

К поверхностноактивным дезинфектантам, из которых готовят 3%-ные растворы, относят:

- пиртан;

- амфолан;

- 3Д-Септ.

Альдегиды:

- формальдегид, входит в состав формалина (40%-ный раствор формальдегида);

- глутаровый альдегид (25%-ный раствор глутарового альдегида).

Альдегиды используют в виде аэрозоля и 5 – 2,5%-ных растворов.

Современные средства дезинфекции имеют комбинированный состав формальдегида, хлорида аммония солей нитрилтрехуксусной кислоты и ПАВ:

- экоцид;

- макродез;

- микродез.

Антисептические препараты (греч. anti – против, septikos нагноение) используют для уничтожения микроорганизмов на коже, слизистых, в ранах. Ведущие препараты:

- настойка йода, этиловый спирт на коже;

- перекись водорода 3%-ный раствор, раствор фурациллина 1:5000 для промывания ран;

- раствор фурациллина 1:5000;
- 1%-ный раствор борной кислоты для промывания слизистых;
- хлоргексидин.

Химиотерапевтические препараты - химические вещества избирательного действия против болезнетворных микробов в условиях микроорганизма. Основоположителем химиотерапии является немецкий ученый П. Эрлих, синтезировавший в 1910 году первый химиотерапевтический препарат сольварсан, содержащий соединения мышьяка.

Первыми нетоксичными химиотерапевтическими средствами были сульфаниламидные препараты, производные сульфаниловой кислоты. Впервые синтезированы Домагком в Германии в 1935 году и П.А. Куянцевым в 1939 году в СССР (стрептоцид). Широко применяют внутривенно и внутрь до настоящего времени как системные бактериостатики. Ведущие препараты: бисептол, стрептоцид растворимый, сульгин, сульфален, фталазол и др. Структурно близкие к сульфаниламидам парааминосалициловая кислота (ПАСК) и сульфоны (дапсон), эффективны для лечения различных микобактериозов (туберкулез, лепра).

Производные нитрофурана представлены синтетическими нитрофуранальдегидами, вызывающими бактерицидный эффект *in vitro*. Применяют внутрь для лечения инфекций ЖКТ и мочевыводящих путей (фуразолидон, фурагин, нитрофурантоин, нифуроксазид).

Хинолоны самые эффективные противомикробные препараты, бактерицидного действия на широкий спектр микрофлоры. Применяют внутримышечно, внутривенно и внутрь (энрофлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, налидиксовая кислота).

Таблица 5 - Распределение антибиотиков по группам на основе химической структуры и клинического применения

| Группы | Тип антибактериального действия, название препаратов |
|----------------|------------------------------------------------------|
| Пенициллины | |
| Цефалоспорины | |
| Аминогликозиды | |
| Тетрациклины | |
| Макролиды | |
| Линкозамиды | |
| Рифампицины | |
| Хлорамфениколы | |
| Полипептиды | |
| Плевромутилины | |

Антибиотики химические вещества биологического происхождения, а также их производные и синтетические аналоги, подавляющие патогенных микроорганизмов, задерживающие рост злокачественных опухолей.

Антибиотики относят к этиотропным средствам, избирательно подавляющих микроорганизмы, поэтому эффективность лечения зависит от чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Существуют лабораторные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: *качественный – диско-диффузионный метод (ДДМ) и количественный – метод серийных разведений.*

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и другим АБП

Выполняют исследования согласно Методического указания МУК 4.2. 1890-04.

ДДМ определения чувствительности основан на

способности антибактериальных (АБП) диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Для определения чувствительности ДДМ на питательную среду АГВ или агар Мюллера-Хинтона в чашке Петри делают посев исследуемой взвеси, содержащей $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл газоном и через 15 мин раскладывают диски с АБП, не более 6 дисков на одну чашку. Посев ставят в термостат на 18-24 часа при 35° С. После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность и определяют диаметр зон задержки роста, используя миллиметровую бумагу. Результаты анализируют по таблице 6.

Метод серийных разведений в бульоне имеет два варианта: макрометод (пробирочный) и микрометод (при величине конечного объема 0,2 мл и меньше). Область применения макрометода из-за низкой производительности ограничивается случаями необходимости оценки чувствительности единичных штаммов. Питательный бульон разливают по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяют необходимым диапазоном разведений АПБ и увеличивают на одно для постановки отрицательного контроля. Готовят двукратные разведения АБП, затем в каждую пробирку вносят микробную взвесь концентрацией 10^6 КОЕ/мл по 0,5 мл в каждую пробирку, инкубируют в течение 16 – 24 часов. МПК (минимальную подавляющую концентрацию) определяют по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост микроорганизмов. Для определения наличия роста микроорганизмов пробирки с посевами просматривают в проходящем свете, сравнивают с контрольной пробиркой, содержащей исходную взвесь, хранившейся в холодильнике.

Таблица 6 - Критерии интерпретации результатов определения чувствительности: пограничные зоны значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л)

| АБП | Содер. в диске (мкг) | Диаметр зон подавления роста | | | МПК (мг/л) | | |
|-----------------|----------------------|------------------------------|---------|-----|------------|-------|-----------|
| | | Р | П | Ч | Р | П | Ч |
| Пенициллин | 10 | ≤19 | 20-27 | ≥28 | ≥4 | 0,25 | 0,12 |
| Ампициллин | 10 | ≤13 | 14-16 | ≥17 | 32 | 16 | ≤8 |
| Амоксициллин | 20/10 | ≤13 | 14-17 | ≥18 | 32/16 | 16/8 | ≤8 |
| Стрептомицин | 300 | 6 | 7-9 | ≥10 | 1000 | - | ≤100 0 |
| Цефазолин | 30 | ≤14 | 15-17 | ≥18 | ≥32 | 16 | ≤8 |
| Цефотаксим | 30 | ≤14 | 15-22 | ≥23 | ≥64 | 16-32 | ≤8 |
| Цефтриаксон | 30 | ≤13- | 14-20 | ≥21 | ≥64 | 16-32 | ≤8 |
| Канамидин | 30 | ≤13- | 14-17 | ≥18 | ≥64 | 32 | ≤16 |
| Гентамицин | 10 | ≤12 | 13-14 | ≥15 | ≥16 | 8 | ≤4 |
| Тетрациклин | 30 | ≤14 | 15-18 | ≥19 | ≥16 | 8 | ≤4 |
| Окситетрациклин | 30 | ≤12 | 13-15 | ≥16 | ≥16 | 8 | ≤4 |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤12 | 13-17 | ≥18 | ≥32 | 16 | ≤8 |
| Эритромицин | 15 | ≤13 | 14-22 | ≥23 | ≥8 | 1-4 | ≤0,5 |
| Рифампицин | 5 | ≤16 | 17-18 | ≥19 | ≥4 | 2 | ≤1 |
| Хинолоны | | | | | | | |
| Ципрофлоксацин | 5 | ≤15 | 16 - 20 | ≥21 | ≥4 | 2 | ≤1 |
| Офлоксацин | 5 | ≤12 | 13 - 15 | ≥16 | ≥8 | 4 | ≤2 |
| Норфлоксацин | 10 | ≤12 | 13 - 14 | ≥17 | ≥16 | 8 | ≤4 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤12 | 13 - 16 | ≥17 | ≥8 | 4 | ≤2 |

Примечание: Р – резистентные (устойчивые) микроорганизмы; П - промежуточные (умеренно устойчивые); Ч – чувствительные.

По чувствительности к антибиотикам микроорганизмы подразделяют на резистентные (устойчивые), промежуточные (умеренно устойчивые) и чувствительные. Для лечения рекомендуют антибиотики, к которым возбудитель чувствителен, как исключение, промежуточные, но в повышенных дозах.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к бактериофагам

Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные репродуцироваться в микроорганизмах и лизировать их. Лизирующее действие фага внешне можно определить:

- по просветлению бульонных культур;
- образованию прозрачных участков среди сплошного роста агаровых культур.

Бактериофаги применяют для лечения кишечных инфекционных заболеваний, наружно, а по современным данным для лечения септических заболеваний. Эффективность лечения зависит от чувствительности возбудителя к фагу.

Существуют качественные методы определения чувствительности микроорганизмов к фагам и количественные, с помощью которых определяют титр фага.

К качественным методам определения чувствительности микроорганизмов к фагам относят:

- *метод Отто*, когда на ПА, в чашках Петри сеют бульонную культуру 6-часового роста газоном, через 15 мин наносят несколько капель фага, через 16 -18 часов инкубирования в термостате учитывают результат. Положительный характеризуется отсутствием роста в местах капель фага;

- *метод Фюрта*, для этого делают посев молодой бульонной культуры на ПА в чашке Петри штрихами, через 15 мин наносят капли фага, через 16 – 18 часов выдерживания в термостате учитывают результат. Положитель-

ный также характеризуется отсутствием роста (образованием прозрачных участков) в местах капель фага.

Чтобы определить титр фага, что обязательно для рекомендации фага с лечебной целью, пользуются количественными методами:

- *метод Анпельмана*, когда в 10 пробирок разливают по 4,5 мл МПБ или ПБ, в первую вносят 0,5 мл испытуемого фага и готовят десятикратные разведения: 1:10, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} из девятой пробирки 0,5 мл выливают, десятая пробирка - контрольная, фага не содержит. Затем во все пробирки вносят по 1 капле бульонной культуры возбудителя 16-часового роста, ставят в термостат. Через 16 – 18 часов проводят учет, определяя титр фага, его наибольшее разведение, которое задерживает рост возбудителя. Для лечения рекомендуют фаги с титром 10^{-4} и больше;

- *метод Грациа*, когда чашки Петри с ПА засевают бульонной культурой «газоном», со стороны дна разделяют поверхность газона на сектора. На каждый сектор наносят по капле фага в разном разведении. Через сутки, после выдерживания в термостате, учитывают результат, определяя титр по участкам отсутствия роста.

Вопросы для обсуждения

1. Типы взаимоотношений в микромире.
2. Характеристика и классификация антибиотиков.
3. Продуценты антибиотиков.
4. Применение антибиотиков и характеристика кормовых антибиотиков.
5. Характеристика фагов.

ТЕМА 6

Санитарно-гигиеническая оценка почвы. Круговорот азота и углерода. Микрофлора воды и воздуха, санитарно-бактериологическая оценка

Цель занятия. Разобрать и освоить методику санитарно-бактериологического исследования почвы. Разобрать механизм круговорота азота и углерода в почве. Разобрать и освоить методику исследования и учета санитарно-бактериологической оценки воды и воздуха.

Оборудование и материалы. Образцы почвы, питательные среды для посева почвы. Посевы возбудителей по ДДМ. Образцы бактериальных землеудобрительных препаратов. Питательные среды для посева воздуха, образцов воды для санитарно-бактериологической оценки. Аппарат Кротова. Посевы воды, воздуха готовые к учету.

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести учет посевов по ДДМ на прошлом занятии. 2. Освоить методику санитарно-гигиенической оценки почвы. 3. Разобрать механизм круговорота азота и углерода, познакомиться с образцами землеудобрительных препаратов. 4. Разобрать и освоить методики исследования и учета санитарно-бактериологической оценки воды. 5. Разобрать методики исследования и учета санитарно-микробиологической оценки воздуха.

Таблица 7 - Чувствительность испытуемой культуры к АБП

| АБП | Диаметр зоны | Чувствительность | Заключение |
|-----|--------------|------------------|------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Продолжение таблицы 7

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Таблица - 8 Категория загрязненности почвы

| Категория загрязненности | Количество колоний БГКП | Количество Колоний энтерококков | Патогенные бактерии |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| | | | |

Санитарно-бактериологическая оценка почвы

Санитарно-бактериологическую оценку почвы проводят согласно МУ 2.1.7.730-99. Подлежат исследованию почвы:

- детских дошкольных учреждений 2 раза в год;
- участков под жилищное, животноводческое строительство, зон отдыха на месте бывших свалок, кладбищ, скотомогильников;
- вблизи колодцев и рек, в том числе в связи с загрязнением грунтовых вод и по эпизоотологическим и эпидемиологическим показаниям.

Образцы почв массой 200 г берут с двух участков площадью 25 м² в пяти точках стерильным совком на глубине 10 см, на бывших кладбищах и свалках – 25 см.

Санитарно-бактериологическое исследование включает определение:

- *коли-индекса* (количество бактерий кишечной палочки БГКП в 1 г почвы), посевом разведения почвы 1:10 на 5 чашек со средой Эндо;
- *индекса энтерококков* (количества энтерококков в 1 г почвы), посевом разведения почвы 1:10 на 5 чашек с сывороточно-теллуриновым агаром;

- *патогенных бактерий* (наличие колоний с зоной β-гемолиза), посевом разведения почвы 1:10 на 5 чашек с кровавым агаром;

- сальмонелл, посевом 1 г образца на селенитовый бульон.

Посевы выдерживают 24 часа, подсчитывают количество колоний. Результат анализируют по таблице 9.

Таблица 9 – Категории загрязненности почв

| Категория загрязненности | Количество колоний БГКП | Количество колоний энтерококков | Патогенные бактерии |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Чистая | 1-9 | 1-9 | Нет |
| Загрязненная | 10 и больше | 10 и больше | Есть |

При наличии роста на селенитовой среде исследования продолжают: делают посевы на среду Эндо, отсевают бесцветные колонии, идентифицируют выделенную культуру по биохимическим, протеолитическим и антигенным свойствам.

Способность почвы к самоочищению обусловлена:

- деятельностью гнилостных бактерий и бактерий разлагать белковые соединения животного, растительного происхождения;

- минерализацией образующегося при гниении аммиака нитрифицирующими бактериями;

- активностью целлюлозолитических бактерий в аэробных и анаэробных условиях разлагать клетчатку, минерализовать образующиеся соединения.

Круговорот азота

Почва – среда обитания многочисленных микробов, которые осуществляют круговорот, N, C, H, S, P, Fe и др. элементов. Такие процессы повышают плодородие почвы.

В почве много возбудителей, длительно хранятся в ней споры таких возбудителей как столбняк, ботулизм, эмкар, злокачественный отек.

Больше всего микробов в черноземных почвах, в неплодородных – мало.

Важное значение для плодородия имеет круговорот азота, его осуществляют микроорганизмы в несколько процессов.

Начинается круговорот гниением или аммонификацией.

Аммонификация – (гниение) разложение растительного, животного белка.

В аэробных условиях белок разлагается с образованием преимущественно: NH_3 , CO_2 , H_2O , сульфатов, некоторая часть NH_3 улетучивается и разлагается до молекулярного N_2 и молекулярного H_2 , остальная часть – усваивается бактериями.

Гниение в аэробных условиях проводят: - *Bacillus subtilis* – сенная палочка; *Bac.mycoides* – корневидная бацилла; *Bac. mesentericus*- картофельная палочка; *Bac.megaterium* – капустная палочка; *Proteus vulgaris* – вульгарный протей, имеет факультативный тип дыхания, но тяготеет к аэробным условиям; *Bac.cereus*; *E.coli* – кишечная палочка.

Перечисленные микробы имеют набор протеолитических ферментов протеаз и пептидаз, с помощью которых расщепляют белки до полипептидов и олигопептидов. Образовавшиеся аминокислоты преобразуются дезаминированием, декарбоксилированием, переаминированием, в результате образуется NH_4^+ , CO_2 и вода.

В анаэробных условиях белки также под действием протеаз и пептидаз разрушаются до аминокислот, которые подвергаются декарбоксилированию, переаминированию, дезаминированию до NH_4^+ , CO_2 , аминов, H_2S , воды и органических кислот.

При гниении белков животного происхождения в анаэробных условиях вместо аминов чаще образуются диамины или птомаины, ядовитые соединения, из которых самый ядовитый кадаверин в совокупности их называют трупным ядом.

Гниение в анаэробных условиях проводят: *Cl. putrificum*; *Cl. sporogenes*.

Многие виды гнилостных бактерий, такие как протеи, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Bac.cereus* относят к условно – патогенным бактериям, способным вызывать гнойно – септические процессы у ослабленных (переохлаждением, потерей крови, бескормией) взрослых животных и молодняка первых дней жизни. Способ их проникновения: через раны, пищеварительный тракт. Поэтому ослабленных, новорожденных надо защищать от гнилостных бактерий почвы, применяя санитарно – гигиенические мероприятия при кормлении, оказании хирургической помощи.

Животные, люди выделяют много мочи, ее состав мочевины, мочевого, гиппуровая кислоты, составные части мочи преобразуются микробами, гиппуровая и мочевины кислоты подвергается гидролизу. Больше всего в моче – мочевины, ее преобразуют уробактерии, они содержат фермент уреазу, с помощью которого мочевины подвергают гидролизу.

$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} = (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ углеаммиачная соль распадается до $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

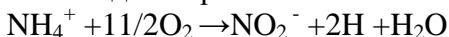
Уробактерии могут размножаться при pH 9-10, к ним относят *Micrococcus ureae*, *Sporosarcina ureae*, в анаэробных условиях расщепляет мочевины *Bac.pasteurii*.

Мочевина может образовываться при распаде аргинина, ее образуют и накапливают шляпные грибы (шампиньоны), сама мочевины растениями не усваивается.

Аммиак, образующийся при гниении, очень быстро окисляется.

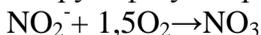
Процесс окисления аммиака до нитритов и нитратов называют *нитрификацией*.

Впервые микробов - нитрификаторов, окисляющих аммиак, выделил С.Н. Виноградский в 1890 – 1892 гг. Было установлено, что первую фазу нитрификации, т.е. окисление аммиака до нитритного кислотного остатка



осуществляют бактерии четырех родов *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*.

Вторую фазу нитрификации, т.е. окисление



до кислотного остатка азотистой кислоты в кислотный остаток азотной кислоты проводят бактерии из рода *Nitrobacter*.

Энергию, образованную за счет окисления кислотных остатков нитрифицирующие бактерии используют для ассимиляции CO_2 , т.е. все нитрифицирующие бактерии аутотрофы, аэробы, NH_3 – субстрат для дыхания.

Образующие азотистая и азотные кислоты усваиваются растениями, но большая часть нитритных и нитратных кислотных остатков превращается в соли с помощью побочных химических реакций, нитриты и нитрата полностью усваиваются растениями, стимулируют урожайность растений, содержание белка, каротина, витаминов группы В.

Известны гетеротрофные микроорганизмы, способные осуществлять нитрификацию, к ним относят псевдомонады (синегнойная палочка), коринобактерий, нокардии (актиномицеты) и грибы из рода *Fusarium*, они могут окислять аммиак а также амины, амиды.

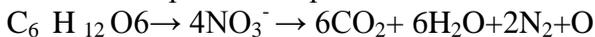
Усиленная нитрификация приводит к закислению почв. В природе существует обратный процесс.

Процесс восстановления нитратов с выделением N_2 или закиси азота N_2O называется *денитрификацией*.

Проходит денитрификация в анаэробных условиях

при участии таких бактерий: *Pseudomonas denitrificans*; *Ps. fluorescens*; *Ps. stutzeri*; *Micrococcus denitrificans*.

Перечисленные микробы в анаэробных условиях имеют нитратное дыхание, т.е. неорганический субстрат окисляется кислородом нитрата.



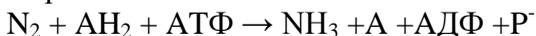
Процесс денитрификации сдерживает закисление почв, что полезно.

Очень бурно денитрификация идет во влажной, уплотненной почве, от чего потери азотсодержащих веществ. Устраняют денитрификацию культивированием, рыхлением.

Среди денитрифицирующих гетеротрофных бактерий есть также условно патогенные, способные вызывать гнойно – септические заболевания: *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens* и др.

Плодородие почвы обусловлено и зависит от уровня *фиксации азота* бактериями.

Процесс восстановления молекулярного азота до аммиака называют *азотофиксацией* проводят многочисленные микробы.



NH_3 – вступает во взаимодействие с кетокислотами бактерий, образуются аминокислоты.

Микробы, усваивающие N_2 , называют *азотфиксаторами*. *Азотфиксаторы подразделяют*: на

- свободноживущий: *Asotobacter chroococcum*, бактерии из группы *Weijrinckia* в честь первооткрывателя Бейеринка в 1901 г, он выделил *Asotobacter chroococcum*, *CL.pasteurianum*, выделен Виноградским 1893 г. *Klibsiella* и др.;

- живущих в симбиозе с растениями: клубеньковые бактерии из рода *Rhizobium*, они живут в симбиозе с бобовыми. Бактерии из рода *Azospirillum* живут в симбиозе со злаковыми травами. Актиномицеты - с кустарниками.

Клубеньковые бактерии внедряются в молодые корни – волоски, приживаясь размножаются, образуют наросты, внутри которых клубеньковые бактерии крупные, грушевидной, сферической или ветвистой формы - бактериоидные формы, активно восстанавливающие азот и выделяющие в сосудистую систему растений аммиак, который взаимодействует с оксикислотами с образованием аминокислот.

Азотфиксаторы интенсивно обогащают почву азотистыми соединениями, входят в состав микробных землеудобрительных препаратов.

Микробные землеудобрительные препараты

Применяют для повышения плодородия почвы, повышения урожайности.

Нитрагин (1896г Ноббе, Гильтнер) - культура клубеньковых бактерий в меловой среде. Применяют под кормовые бобовые: люцерну, люпин, горох, клевер, обязательно указывают название культуры. Нитрагином обрабатывают семена перед посадкой, вначале смачивают, потом смешивают с препаратом.

Азотобактерин – содержит *Asotobacter chroococcum*, применяют под кукурузу, томаты, зерновые, обрабатывают семена.

Ризоторфин – содержит клубеньковых бактерий в торфяной среде, применяют под люпин, сою, люцерну, клевер, указывают название культуры.

Фосфобактерин содержит *Bac. megaterium var. phosphaticum* способную разрушать фосфоорганические соединения и переводить их в доступную для растений форму, применяют под капусту.

Препарат АМБ компост из торфа, раздробленного известняка, фосфоритной муки, маточной культуры (гнилостных, расщепляющих целлюлозу бактерий, автохтонной микрофлоры) применяют в закрытом грунте, для окультуривания почв северной зоны.

Бактериальные земледобрильные препараты стимулируют рост растений, образование и накопление витаминов, белка. В настоящее время в РФ выпускают только ризоторфин.

Круговорот углерода

Разложение клетчатки - целлюлозы осуществляется с помощью микроорганизмов, которых называют *целлюлозолитическими*.

Самый распространенный полисахарид растительного мира – клетчатка, содержит 50% углерода. Разлагается целлюлозолитическими микробами. На дне водоемов, в болотах, глубоких слоях почвы идет анаэробное расщепление клетчатки с помощью: *Cl.omelianskii*; *Cl.cellobipolarae*; *Cl.thermocellum*

Перечисленные микроорганизмы имеют ферменты целлюлазу и целлобиазу, катализирующие гидролиз клетчатки



Глюкоза преобразуется до спиртов, органических кислот, а затем распадается до CH_4 (метана).

Возбудителей анаэробного расщепления клетчатки открыл в 1902 году В.Л. Омелянский.

Большое количество клетчатки находится в поверхностных, хорошо аэрируемых слоях почвы, где ее расщепляют микробы из родов: *Cytophaga*; *Cellulomonas*; *Мухососцевые*; грибы из рода *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*; актиномицеты *Streptomyces*, *Micromonospora*.

Перечисленные микроорганизмы имеют ферменты целлюлазу, целлобиазу, они подвергают гидролизу клетчатку:



превращая глюкозу в оксикислоты, используемую клубеньковыми бактериями для превращения в аминокислоты.

Часть глюкозы превращается в уроновые, гуминовые кислоты, которые идут на формирование гумуса.

Аэробные целлюлозолитические бактерии рода *Sutophaga* были открыты в 1918 г. Хутчинсом, Клейтоном.

Микрофлора воды, санитарно-бактериологическая оценка

Вода – естественная среда обитания всех свободноживущих микроорганизмов. На поверхности обитают аэробные и факультативные микроорганизмы, на дне, больших глубинах – анаэробные.

По происхождению различают воды: атмосферные, наземные, подземные.

Атмосферные в виде дождя, снега, очень загрязнены, можно использовать только для полива растений;

Наземные: реки, озера, пруды, которые используют для водоснабжения и зон отдыха;

Подземные: ▪почвенные – временные очень загрязнены;

▪ грунтовые имеют нижний водоупорный слой, постоянные, на них сооружают колодцы, они также загрязнены микроорганизмами;

▪ межпластовые располагаются на больших глубинах, имеют верхний и нижний водоупорные слои, не содержат микроорганизмы, напорные межпластовые воды называют артезианскими, межпластовые воды используют для водоснабжения;

Родники - грунтовые воды, *ключи* - межпластовые воды на поверхности почвы, используют для питья и водопоя животных.

Питьевая вода, а также предназначенная для зон отдыха, рыбохозяйственных целей, приготовления лекарств подлежит санитарной оценке по *ГОСТ 2874 -82 «Вода пи-*

тьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством» и по МУК 4.2.1018-01. Определяют следующие микробиологические критерии качества питьевой воды:

- *КМАФАнМ* – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 мл воды;
- *Коли индекс* - количество БГКП в 1 л воды;
- *Коли-титр* – наименьший объем воды, в котором обнаруживается одна клетка БГКП.

КМАФАнМ (микробное число) исследуемого образца определяют глубинным посевом 1 мл воды и разведений: 1:10, 1:100 в расплавленный и охлажденный агар для МА-ФАнМ микроорганизмов в чашках Петри. После застывания среды чашки Петри с посевами помещают в термостат и инкубируют при 37⁰ С в течение 24 часов. Учитывают результаты, подсчитывая колонии, умножая на разведения, сумму делят на количество учтенных разведений. Результат выражают КОЕ в 1 мл (см³) исследуемой воды. Анализируют результаты, сравнивая показатели с нормативами таблицы 10.

Таблица 10 - Микробное число воды

| Категория воды | КМАФАнМ /см ³ (мл) |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Вода питьевая | ≤100 |
| Вода дистиллированная | ≤15 |
| Вода зон отдыха | ≤1000 |
| Вода для рыбохозяйственных целей | ≤1000 |

Коли-индекс, свидетельствующий о фекальном загрязнении воды определяют титрационным методом. Для этого делают три посева образца воды по 100 мл на 10 мл глюкозо-пептонной среды Эйкмана в трех флаконах, три

посева по 10 мл на 1мл среды Эйкмана в трех пробирки и три посева в пробирках по 1 мл на 5 мл среды Эйкмана, предварительно разведенной 1:5.

Результат учитывают через 16-18 часов выдерживания в термостате при 37⁰ С по помутнению и газообразованию. В посевах с признаками помутнения и наличия газа в поплавке пересевают на среду Эндо, чтобы исключить БГКП.

Коли - индекс питьевой воды согласно ГОСТ 2874-82 должен быть равен 3, сточной (канализационной) – не более 1000.

Коли-индекс можно определить методом мембранных фильтров, когда воду пропускают через мембранные фильтры №2 – 3 пробы по 100мл, 3 пробы по 10 мл, и 3 пробы по 1 мл, затем фильтры сеют (раскладывают) на среду Эндо. Учет через 16 – 18 часов: подсчитывают количество колоний, умножают на 1000 и делят на объем.

Коли-титр определяют расчетом: 1000мл делят на показатель коли-индекса. Пример $1000:3=333$.

Анализируют и определяют результат по таблице 11.

Таблица 11 - Коли-индекс БГКП при исследовании 333 мл воды

| Количество положительных результатов | | | Коли-индекс |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|
| из трех флаконов по 100 мл | из трех пробирок по 10 мл | из трех пробирок по 1 мл | |
| 0 | 0 | 0 | Менее 3 |
| 0 | 0 | 1 | 3 |
| 0 | 1 | 0 | 3 |
| 1 | 1 | 0 | 4 |
| 1 | 0 | 1 | 7 |
| 1 | 0 | 0 | 4 |

Продолжение таблицы 11

| | | | |
|---|---|---|----|
| 1 | 0 | 1 | 7 |
| 1 | 1 | 0 | 7 |
| 1 | 1 | 1 | 11 |
| 2 | 0 | 0 | 9 |
| 2 | 0 | 1 | 14 |
| 2 | 1 | 0 | 15 |
| 2 | 3 | 1 | 20 |
| 2 | 2 | 0 | 21 |
| 2 | 2 | 1 | 23 |

Санитарно-микробиологическую оценку питьевой воды проводят: при населении 10 тыс. – 2 пробы; при населении 20 тыс. – 10; 50 тыс. – 30 проб; при населении 100 тыс. – 100 проб; при населении более 100 тыс. – 200 проб в месяц. Забор проб воды ведут на насосной станции и в разводящей сети.

Если санитарно-бактериологические показатели воды не соответствуют нормативным, ее обезвреживают, добавляя хлорную известь 0,3 – 0,5 мг/л, озонируют из расчета 5-6 мг/л озона в течение 3 – 5 мин, воздействуют УФ-лучами установки ОВ-АКХ-1.

Животные должны пить водопроводную (питьевую) воду, которую следует доставлять и на пастбища. Запрещено поить животных из непроверенных, по санитарным показателям, наземных водных источников, которые могут быть резервуарами возбудителей лептоспироза, бруцеллеза, сибирской язвы, гельминтов.

Микрофлора воздуха, санитарно-микробиологическая оценка

Воздух не является средой пригодной для обитания микроорганизмов. Микрофлора воздуха непостоянна. Выживаемость микробов зависит от влажности, в аэрозоль-

ном состоянии микроорганизмы могут длительно находиться. В сыром воздухе при плюсовой температуре много возбудителей.

Микроорганизмы попадают в воздух из почвы, с пылью, при испарении воды из водных и атмосферных источников, с поверхности растений, из органов дыхания животных, людей с выдыхаемым воздухом, испарений кожи.

На микроорганизмы губительно действуют: движение воздуха; ультрафиолетовое излучение; фитонциды растений; ионизация.

Санитарную оценку воздуха проводят согласно Гигиеническим требованиям безопасности окружающей среды. Санитарно-эпидемиологические требования и нормативы. СанПин 2.3.21078-01, определяя *микробное число* - количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха.

Определяют микробное число методами:

- *Оседания (седиментационный метод)*, когда чашки Петри со средой для выделения МАФАНМ оставляют открытыми на 5 мин, затем закрывают, ставят в термостат, через 48 часов подсчитывают количество колоний. Расчет микробного числа проводят по формуле Омелянского:

$$\text{Микробное число} = (a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5) : (v \cdot 10 \cdot t),$$

где: - a- количество выросших колоний;
- v- площадь чашки Петри $78,5\text{ см}^2$;
- t – время посева.

- *Аспирационным*, когда посев на среду для выделения МАФАНМ делают с помощью аппарата Кротова, а микробное число рассчитывают по формуле:

$$\text{Микробное число} = (a \cdot 1000) : V,$$

где: -a – количество выросших колоний;

- V – объем пропущенного через прибор воздуха в л;
- 1000 – искомый объем воздуха.

Атмосферный воздух считается чистым, если микробное число летом не превышает 750, а зимой 150 в 1 м^3 . Санитарная оценка воздуха закрытых жилых и производственных помещений представлена в табл. 12.

Таблица 12 - Санитарная оценка воздуха закрытых помещений

| Санитарная оценка воздуха | | Микробное число в 1 м^3 , норматив |
|---------------------------|--------------|------------------------------------------------|
| Лето | Чистый | ≤ 1500 |
| | Загрязненный | ≥ 2500 |
| Зима | Чистый | ≤ 4500 |
| | Загрязненный | ≥ 7000 |

Допустимые показатели микробного числа воздуха в животноводческих помещениях представлены в табл. 13.

Таблица 13 - Микробное число воздуха животноводческих помещений

| Предназначение помещения | Микробное число в 1 м^3 , норматив |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Взрослый крупный рогатый скот и молодняк старше 6 месяцев | 70000 |
| Родильное отделение для коров | 50000 |
| Профилакторий для телят | 20000 |
| Свинарник для холостых свиноматок и откорм | 100000 |
| Свинарник для хряков-производителей и для подсосных свиноматок с поросятами | 50000 |

Продолжение таблицы 13

| | |
|-----------------------|-------|
| Тепляк для окота овец | 50000 |
| Конюшня | 50000 |

Для снижения микробной загрязненности применяют влажную уборку, непрерывную уборку навоза, проветривание, дезинфекцию, ультрафиолетовое облучение, ионизацию.

Вопросы для обсуждения

1. Программированный контроль по теме: «Круговорот азота, углерода».
2. Микрофлора рубца.
3. Микрофлора кишечника.
4. Дисбактериоз, характеристика форм.
5. Пробиотики, пребиотики, синбиотики, симбиотики.

ТЕМА 7

Санитарно-бактериологическая оценка молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений. Микрофлора тела животных

Цель занятия. Разобрать и освоить методику исследования и учета санитарно-бактериологической оценки молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений, общей контаминации объектов окружающей среды. Разобрать микрофлору кожи, вымени, органов дыхания.

Оборудование и материалы. Питательные среды для посева смывов, стерильные пробирки с тампонами и физраствором. Посевы воды, воздуха. Образцы пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков.

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести учет посевов воды, воздуха, сделать заключение. 2. Разобрать и освоить методики исследования и учета санитарно-бактериологической оценки молочной посуды, доильных аппаратов, объектов окружающей среды. 3. Посеять отпечаток кожи, волоса.

Таблица 14 - Коли-индекс БГКП при исследовании 300 мл воды

| Количество положительных результатов | | | Коли-индекс |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|
| из трех флаконов по 100 мл | из трех пробирок по 10 мл | из трех пробирок по 1 мл | |
| | | | |

Таблица 15 – Санитарная оценка воздуха

| Помещение | Микробное число | Виды микробов | Заключение |
|-----------|-----------------|---------------|------------|
| | | | |

Санитарно-бактериологическая оценка молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений

Посуда, доильные аппараты должны быть чисто вымыты, обезжирены, высушены. Контроль санитарного состояния проводит визуально бригадир. Согласно Ветеринарного Законодательства (Рекомендаций по санитарно-бактериологическому исследованию, 10.07.1988 г.) один раз в квартал проверку проводит районная ветеринарная лаборатория. Для этого делают смывы стерильным тампоном погруженным в 10 мл стерильного изотонического раствора:

- с площади 100 см² поверхности ведер, фляг;

- с 4-ех доильных стаканов каждого аппарата;
- с коллектора каждого доильного аппарата;
- со шлангов, на всю длину стержня.

В лаборатории определяют:

- *коли – титр* - наличие БГКП в смыве. Для этого 1 мл смыва сеют в 5 мл среды Кода и 1 мл смыва, разведенного 1:10 изотоническим раствором также сеют на 5 мл среды Кода. Через 16 – 18 часов учет по обесцвечиванию среды, что свидетельствует о наличии БГКП. Заключение о санитарном состоянии посуды и оборудования дают по таблице 16.

Таблица 16 – Санитарно-бактериологические показатели смывов

| Наименование посева | Наличие роста | Санитарное состояние |
|-------------------------------|---------------|----------------------|
| 1 мл смыва | - | Хорошее |
| 1 мл смыва, разведенного 1:10 | - | |
| 1 мл смыва | + | Удовлетворительное |
| 1 мл смыва, разведенного 1:10 | - | |
| 1 мл смыва | + | Неудовлетворительное |
| 1 мл смыва, разведенного 1:10 | + | |

Оценку санитарного состояния птицепомещений проводят после подготовки объекта к заселению молодняком. Для этого делают смывы двукратным протиранием площади 100 см² стерильным тампоном, погруженным в 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. 1 мл смыва сеют на 5 мл среды Кода, так как результат подготовки объекта для заселения должен быть

только хороший. Если среда Кода после посева смыва обесцвечивается, что свидетельствует о наличии БГКП, очистку и дезинфекцию птицепомещения повторяют.

Определение общей микробной контаминации объектов окружающей среды

Проводят согласно СанПин 2.3.21078-01 из смывов, выполненных с анализируемой площади.

Анализ общей микробной контаминации необходим, если происходит порча молока и для контроля санитарного состояния перерабатывающих предприятий.

Смывы выполняют с площади 100 см^2 , используя рамку – шаблон, стерильным тампоном с 10 мл стерильной дистиллированной водой (1%-ный раствор пептона, или физиологический раствор). Готовят разведения смывов: 1:10, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 1 мл каждого смыва сеют в питательный агар или среду для выделения МАФАНМ глубинным способом. Через 48 часов подсчитывают колонии, умножают на разведение, определяют сумму и делят на количество учтенных разведений. Микробное число (общая микробная контаминация) молочной посуды, оборудования не должны превышать 50 тыс. КОЕ/мл.

По СанПин 2.3.21078-01 общую обсемененность предметов рассчитывают по формуле :

$$M = N \cdot a/S,$$

где M – общая микробная обсемененность, N – количество колоний в 1 мл разведения смыва; a – разведение смыва; S – площадь, с которой сделан смыв, см^2 . Результат выражают числом КОЕ на 1 см^2 исследуемой поверхности. Нормативные показатели предметов окружающей среды по санитарно-микробиологическим тестам представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Критерии оценки по санитарно-микробиологическим тестам предметов окружающей среды

| Оценка объекта | Общая микробная обсемененность КОЕ/см ² |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| Чистый | До 10000 |
| Умеренно загрязненный | 10000 - 100000 |
| Сильно загрязненный | Более 100000 |

Для исключения присутствия БГКП, смывы сеют в среду Кесслер, учет через 48 часов, отмечают как положительные пробирки, в которых помутнение, наличие газа в поплавке, изменение цвета, так и отрицательные без признаков роста, они дальнейшему исследованию не подлежат.

Из пробирок с положительным ростом выполняют пересев на среду Эндо, через 18 – 20 часов изучают характер роста, проводят бактериоскопию колоний темно-фиолетового и розового цвета с металлическим блеском, в случае обнаружения грамтрицательных коротких палочек делают вывод о присутствии на исследуемом образце БГКП.

Микрофлора кожи

Постоянные обитатели кожи – стафилококки и стрептококки разных видов, они живут в просвете сальных и потовых желез, используя для питания секреты этих желез. При усиленном сало-, потоотделении активно пролифелируют, вызывая воспаление и образование фурункулов, карбункулов, абсцессов, флегмон.

На кожи присутствуют микрококки, актиномицеты, плесневые грибы, кишечные бактерии, гнилостные бациллы, они попадают на кожу с пылью, при контакте с почвой, навозом. Много микроорганизмов на коже покрытой шерстью, меньше на безволосой.

Микроорганизмы на коже уничтожают при выполнении инъекций, операций. Для лечения ран используют антисептические и другие средства АПБ. Эффективность лечения ран зависит от плотности микроорганизмов. Раны инфицированные плохо заживают или вообще не заживают, чистые, практически без микробные зарастают эпителием или соединительной тканью.

За чистотой кожи животных необходимо следить и устранять загрязнения, избыток сала, пота.

При выполнении чистой работы, приеме пищи руки моют, перед хирургической операцией особенно тщательно, голову закрывают колпаком.

Чистоту рук проверяют посевом смыва тыльной части ладони, ладони, межпальцевой поверхности, ногтевого ложа и подноготного пространства на среду Эндо, среду Кесслер, чтобы исключить присутствие БГКП.

Микрофлора органов дыхания

По заселению микроорганизмами в норме и патологии органы дыхания подразделяют на верхние, средние, нижние дыхательные пути и легкие.

В норме микроорганизмы присутствуют в верхних дыхательных путях, на слизистой носа, гортани. Состав микрофлоры непостоянный и соответствует микрофлоре воздуха. Активное размножение подавляется лизоцимом, интерфероном.

Средние дыхательные пути - трахея содержат единичные микроорганизмы и только в верхней трети.

Нижние дыхательные пути – бронхи стерильные. Легкие стерильные. Если в эти органы попадают микроорганизмы, что возможно при ослаблении защитных сил в результате переохлаждения (простуде), возникает воспаление: бронхит, пневмония. Для лечения применяют АБП бактерицидного действия.

Чаще при простуде активизируется микрофлора слизистой верхних дыхательных путей, возникает воспаление: ринит, ларингит, если не применять АБП бактериостатического действия, то микрофлора распространяется на слизистую трахеи, возникает трахеит, а далее бронхит и пневмония.

Микрофлора вымени

Микробы обитают в сосковом канале, молочной цистерне, молочных протоках (единичные особи). Альвеолы, где идет фильтрация молока из крови – стерильные.

Микроорганизмы в сосковый канал попадают с кожи, подстилки, аппарата. Почти всегда выделяют микрококки: *Micrococcus luteus*, *M.flavus*, *Corynebacterium bovis*, *Str.lactis*. При содержании на грязной подстилке в молочную цистерну могут внедриться в больших количествах маслянокислые клостридии, гнилостные бациллы, которые будут придавать молоку запах и привкус.

Если микроорганизмы проникают в альвеолы, возникает мастит. Возможности вызвать катаральный и серозный мастит имеют *Str.agalactia* 70 -80% случаев, *St.aureus*, *E.coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Ps.aeruginosa*, *Proteus vulgaris*. Для лечения мастита применяют АБП цистернально и внутримышечно.

Вопросы для обсуждения

1. Понятие инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь.
2. Формы инфекции.
3. Патогенность, вирулентность, факторы вирулентности.
4. Пути распространения возбудителей по организму и способы заражения.

ТЕМА 8

Препараты специфической профилактики, терапии и диагностики инфекционных болезней

Цель занятия. Изучить характеристику вакцин, сывороточных препаратов, аллергенов, диагностикумов, познакомиться с образцами.

Оборудование и материалы. Посевы смывов, кожи. Образцы вакцин, сывороток, аллергенов, диагностикумов.

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести учет посевов смывов, кожи, дать заключение.
2. Разобрать характеристику вакцин, сывороток, аллергенов, диагностикумов, познакомиться с образцами.

Таблица 18 - Санитарно-бактериологические показатели смыва

| Наименование посева | Наличие роста | Санитарное состояние |
|-------------------------------|---------------|----------------------|
| 1 мл смыва | | |
| 1 мл смыва, разведенного 1:10 | | |

Таблица 19 - Критерии оценки по санитарно-микробиологическим тестам предметов окружающей среды

| Оценка объекта | Общая микробная обсемененность КОЕ/см ² |
|----------------|----------------------------------------------------|
| | |

Препараты для специфической профилактики, лечения, диагностики инфекционных заболеваний называют

биопрепаратами. Для ветеринарной практики выпускают более 150 наименований биопрепаратов. Производят их на биофабриках, биокомбинатах. Для медицинских целей биопрепараты изготавливают в НИИ вакцин и сывороток.

Вакцины, характеристика

Вакцины – антигенные препараты для создания активного искусственного иммунитета. Выпускают и используют несколько типов вакцин.

- *Живые вакцины* – взвеси ослабленных возбудителей. Выпускают жидкие и лиофильно высушенные вакцины. Широко применяют для профилактики сибирской язвы (вакцина из штамма СТИ, вакцина из штамма 55 ВНИВВиМ), трихофитии (вакцина ЛТФ 130, вакцина Триховак), рожи свиней (вакцина из штамма VR 2), листериоза (вакцина АУФ), сальмонеллеза свиней (вакцина из штамма ТС-130, вакцина из штаммов №5 и №9). Главное преимущество живых вакцин, они создают напряженный и длительный иммунитет, но могут давать осложнения у ослабленных и инфицированных животных.

- *Убитые вакцины (инактивированные)* – взвеси вирулентных возбудителей, инактивированные формалином, пропиолактоном, гидроксиломином, этиленимином и сорбированные на адьювантах.

Адьюванты (фр. Adjuvans – помогающий, полезный) – вещества усиливающие и пролонгирующие иммунный ответ. К ним относят: алюмокалиевые квасцы, гидроокись алюминия (гидрооксал, промышленное производство на Щелковском биокомбинате), сапонин (применяют в составе биопрепаратов для медицинских целей) – экстракт коры мыльного дерева. Сапонин входит в состав вакцин для животных, но в смеси с гидрооксалом. В качестве адьюванта применяют смесь ланолина и вазелинового масла. Вакцины, содержащие масляный адьювант, называют эмульгированными. Перспективно в качестве адьюванта использовать синтетические полимеры.

Убитые вакцины менее эффективны, чем живые, но они не дают осложнений, поэтому их также широко применяют: концентрированная формолквасцовая вакцина против паратифа телят, концентрированная гидроокисьалюминиевая формолвакцина против рожи свиней и др.

К убитым вакцинам относят:

- *сплит-вакцины* - экстракты поверхностных структур возбудителей, например инактивированная вакцина против пастереллеза кур;

- *субъединичные вакцины* – очищенные экстракты протективных антигенов возбудителей.

- *Анатоксины* (греч. ana – обратно, toxikon – яд) - обезвреженные формалином экзотоксины возбудителей, сорбированные на адьювантах. Применяют для профилактики инфекционных заболеваний, в патогенезе которых важная роль принадлежит токсинам (ботулизм, столбняк, эмкар, браздот, злокачественный отек). Анатоксины выпускают в форме моно - (гидроокисьалюминиевая формолвакцина против эмкара) и ассоциированных (вакцина против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека и анаэробной дизентерии ягнят).

В медицине анатоксины представляют собой комплекс бактериальных полисахаридов и обезвреженных, очищенных токсинов, поэтому их относят к молекулярным вакцинам.

- *Поливалентными* называют вакцины против разных серогрупп или серовариантов возбудителей (поливалентная гидроокисьалюминиевая вакцина ВГНКИ против лептоспироза животных).

- *Ассоциированные вакцины* содержат комбинацию антигенов разных возбудителей (ассоциированная вакцина против эшерихиоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции телят).

Вакцины применяют клинически здоровым животным строго по инструкции: подкожно, внутримышечно, внутрикожно, птице- аэрозольно, выпаивая с водой. Фор-

мируется иммунитет в течение 7-14 дней после введения, напряженность составляет 11-12 месяцев. Исключение составляет напряженность иммунитета после введения вакцины ЛТФ-130 против трихофитии. Иммунитет против трихофитии формируется в течение 30 дней после двукратной иммунизации, напряженность 4 года.

Вакцины всех типов после приготовления проверяют по трем показателям:

- стерильность, по отсутствию роста у инактивированных препаратов и чистоте роста у живых;
- безвредность определяют биопробой на лабораторных животных, вакцина не должна вызывать заболевание и гибель лабораторных животных;
- активность (иммуногенность) также определяют биопробой на лабораторных животных, заражая заведомо летальной дозой, 80% вакцинированных должны выжить, контрольные - погибнуть.

Иммунные сыворотки, иммуноглобулины

Иммунные сыворотки содержат иммуноглобулины (Ig), нейтрализующие токсины и способствующие элиминированию возбудителя из организма, представляют собой сыворотки крови гипериммунных животных-продуцентов.

Гипериммунизация предусматривает многократное введение нарастающих доз антигена с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма и максимального накопления Ig (иммуноглобулинов), уровень которых должен обеспечить при применении лечебный, профилактический или диагностический эффект.

В качестве доноров-продуцентов гипериммунных сывороток используют лошадей, волов, кроликов, которым вводят антигены по разработанной схеме, по окончании цикла проводят кровопускание в объеме 13 % от массы тела животного.

Иммунные сыворотки подразделяют на:

- *лечебно-профилактические;*

▪ *диагностические.*

Лечебно-профилактические сыворотки используют для лечения инфекционных заболеваний (пастереллеза, паратифа, сибирской язвы) и для профилактики при условии высокого риска заражения, пассивный иммунитет формируется сразу, а напряженность -14 суток. Продуценты лечебно-профилактических сывороток лошади и волы. Лечебно-профилактические сыворотки применяют подкожно или внутримышечно в нескольких местах (лечебная доза 50-100 мл), чаще однократно. Осложнения: анафилактический шок, сывороточная болезнь отмечают при применении сывороток гетерогенных видов животных.

Диагностические сыворотки используют в серологических реакциях для определения вида, сероварианта или серогруппы возбудителя. Продуценты – кролики, которых после цикла иммунизации тотально обескровливают.

Иммуноглобулины- 10%-ный раствор глобулиновой фракции иммунной сыворотки. Содержит β , γ -глобулины, других балластных белков нет. Препараты более эффективны, не дают осложнений. Применяют подкожно с лечебной и профилактической целью, доза в несколько раз меньше, чем сыворотки. Биопромышленность выпускает:

- глобулин против болезни Ауески;
- неспецифический нормальный глобулин;
- антирабический, флюоресцирующий для диагностических целей.

Контроль сывороточных препаратов включает проверку на:

- стерильность (нет роста аэробов, анаэробов, грибов);
- безвредность – введением лабораторным животным – 100% -ная сохранность;
- специфическую активность (определение превентивных свойств) определяют заражением иммунизированных и контрольных животных. Иммунизированные должны оставаться здоровыми при гибели контрольных.

Аллергены

Аллергены-экстракты возбудителей или фильтраты бульонных культур, которые применяют для выявления повышенной чувствительности организма к возбудителю. Аллергены используют для диагностики хронических, скрыто протекающих заболеваний: туберкулеза, бруцеллеза у свиней, сапа.

Выпускают очищенные и нативные аллергены. *Очищенные* – лиофильно (сублимационно) высушенные, не содержащие балластных соединений, экстракты возбудителя, к ним относят ППД – туберкулин, КАМ-аллерген. *Нативные* (природные): маллеин, бруцеллин - фильтраты бульонных культур возбудителей.

Аллергены применяют:

- внутривожно (ППД-туберкулин, КАМ, бруцеллин), у больных в месте введения возникает воспаление, у крупного рогатого скота увеличение толщины кожной складки;
- закапывая на конъюнктиву (маллеин), у больных сапом лошадей гнойный конъюнктивит.

Антигены (диагностикумы)

Антигены (диагностикумы) - взвеси или экстракты возбудителей для выявления специфических Ig в сыворотке крови обследуемых, положительно реагирующих считают больными.

Выпускают несколько типов антигенов:

- взвеси убитых возбудителей (единый бруцеллезный антиген);
- растворимые – экстракты возбудителей (сапной антиген);
- эритроцитарные – экстракты возбудителей, сорбированные на формализированных эритроцитах барана (пуллорный эритроцитарный антиген, сальмонеллезный эритроцитарный диагностикум).

Вопросы для обсуждения

1. Коллоквиум №2 по разделам «Действие физических, химических, биологических факторов на микробы, экология микроорганизмов, биопрепараты для профилактики, лечения, диагностики инфекционных заболеваний»

Вопросы коллоквиума №2

1. Методы стерилизации.
2. Характеристика дезинфицирующих, антисептических препаратов.
3. Характеристика химиотерапевтических препаратов.
4. Антибиотики, классификация.
5. Продуценты антибиотиков.
6. Методы определения чувствительности к антибиотикам.
7. Применение антибиотиков.
8. Характеристика кормовых антибиотиков.
9. Характеристика фагов.
10. Типы взаимоотношений у микробов.
11. Микрофлора кожи.
12. Микрофлора вымени.
13. Микрофлора мочеполовых путей.
14. Микрофлора органов дыхания.
15. Микрофлора рубца.
16. Микрофлора кишечника.
17. Дисбактериозы.
18. Пробиотики, пребиотики, симбиотики, синбиотики.
19. Микрофлора воды, санитарная оценка.
20. Микрофлора воздуха, санитарная оценка.
21. Санитарная оценка почвы.
22. Санитарная оценка доильного оборудования, молочной посуды, оборудования птицепомещений.
23. Вакцины.
24. Иммунные сыворотки.

25. Аллергены.
26. Антигены (диагностикумы).
27. Понятия инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь.
28. Формы инфекции.
29. Патогенность, факторы вирулентности.
30. Характеристика фагоцитоза.
31. Гуморальные показатели естественной резистентности.
32. Виды и категории иммунитета.
33. Антигены, характеристика.
34. Ig характеристика.

ТЕМА 9

Реакция агглютинации и современные разновидности

Цель занятия. Разобрать сущность, методику постановки и учета РА. Разобрать разновидности РА, методику постановки и учета РНГА.

Оборудование и материалы. Пробирки, штативы Флоринского, пипетки, физраствор, сыворотки крови, диагностикумы, Плексигласовые пластины, пипетки-автоматы, физраствор, эритроцитарный антиген.

Задание для самостоятельной работы студентов. 1. Поставить и учесть РА, РБП, РНГА.



Рис. 9. Результаты РА

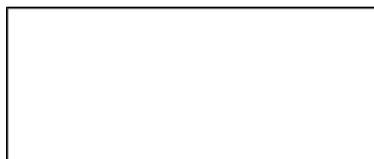


Рис. 10. Результаты РБП



Рис. 11. Результаты РНГА

Реакция агглютинации (РА)

Сущность реакции агглютинации заключается в склеивании антигена антителами в присутствии электролитов, с выпадением образовавшегося комплекса в осадок.

Реакцию агглютинации ставят *с целью*:

- *обнаружения антител в сыворотке крови обследуемых*, используя заведомо известный антиген, положительно реагирующих считают больными;
- *определения вида, сероварианта возбудителя*, используя заведомо известную сыворотку.

Реакцию агглютинации ставят двумя способами:

- по типу *пробирочной* в пробирках Флоринского;
- по типу *капельной* на предметном стекле или пластине.

При постановке *пробирочной реакции* вначале в ряд пробирок наливают физиологический раствор, затем готовят разведения сыворотки, потом вносят антиген.

Учет реакции проводят через 18 – 20 часов выдерживания в термостате при 37°C , а затем час при комнатной температуре. Интенсивность агглютинации оценивают в крестах:

- *четыре креста* – (#) соответствует 100%-ной агглютинации, выпадает осадок в виде зонтика, надосадочная жидкость прозрачная;
- *три креста* – (+++) – 80%-ная агглютинация, осадок зонтик, надосадочная жидкость слегка мутная;
- *два креста* – (++) – 50%-ная агглютинация, осадок диск, надосадочная жидкость мутная;

▪ *отрицательная* реакция (-) характеризуется равномерным помутнением.

Контролем реакции агглютинации в пробирках являются отрицательные результаты взаимодействия:

- антигена с нормальной сывороткой кролика;
- антигена и физиологического раствора.

Капельную реакцию агглютинации ставят на предметном стекле или пластине, смешивая каплю сыворотки и каплю антигена. В положительных случаях, если антиген подходит антителу образуются хлопья:

- *четыре креста* – (#) – крупные хлопья и прозрачная жидкость;
- *два креста* – (++) – мелкие хлопья и мутная жидкость.
- *отрицательная* – (-) – равномерная взвесь.

Учитывают капельную РА спустя 5-8 мин после постановки.

Методика постановки реакции агглютинации для диагностики бруцеллеза

При исследовании сыворотки крупного рогатого скота в пять пробирок разливают 0,5%-ный фенолизированный раствор натрия хлорида: в первую - 2,4 мл раствора, в последующие – 0,5 мл, затем в первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки.

При исследовании сыворотки от мелкого рогатого скота используют фенолизированный 5%-ный раствор хлорида натрия. В первую пробирку вносят 0,2 мл сыворотки и 2,3мл раствора, в последующие пробирки разливают также по 0,5 мл хлорида натрия.

Готовят разведения: из первой 0,5 мл переносят во вторую пробирку, смешивают и так далее, из последней 0,5

мл выливают. Затем в каждую пробирку вносят, начиная со второй, по 0,5 единого бруцеллезного антигена.

После добавления антигена разведение сыворотки в каждой пробирке удваивается разведения сыворотки крупного рогатого скота будут составлять 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, а в сыворотке мелкого рогатого скота : 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

Ставят контрольные реакции:

- с нормальной или негативной сывороткой кролика в испытуемых разведениях;
- с позитивной бруцеллезной сывороткой в разведениях до предельного титра.

После добавления компонентов пробирки встряхивают, помещают в термостат при $37 - 38^{\circ} \text{C}$ на 16-20 часов, затем час выдерживают при комнатной температуре и проводят учет.

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крупного рогатого скота в разведении 1:200, овец и коз в разведении 1:100.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении у крупных животных 1:50, овец и коз – 1:25, сыворотки таких животных подлежат повторному исследованию через 3 – 4 недели. Обследуемых, у которых дважды получены сомнительные результаты относят к положительно реагирующим.

Методика постановки и учета Роз-бенгаловой пробы (РБП)

Капельную РА применяют для выявления бруцеллезных Ig в сыворотке крови крупного и мелкого рогатого скота.

Исследуемую сыворотку в объеме 0,3 мл вносят на дно пластины, добавляют 0,03 мл роз-бенгал-антигена, тщательно перемешивают покачиванием в течение 4 мин.

Одновременно ставят контроли с позитивной, негативной сыворотками и физраствором. Учитывают в крестах:

- *четыре креста* – (#) - крупные хлопья и прозрачная жидкость;
- *два креста* – (++) – мелкие хлопья и мутная жидкость;
- отрицательная – (-) – равномерная взвесь.

Современные разновидности РА

Существует несколько разновидностей реакции агглютинации.

- *Кольцевая реакция с молоком КРА*, ставят в пробирках Флоринского, когда к 2 мл молока добавляют 0,2 мл антигена для КРА, смешивают, выдерживают в термостате 37⁰ С 45-60 мин, учитывают результат. При наличии в молоке бруцеллезных Ig образуется комплекс, сорбирующийся на каплях жира с образованием синего кольца в слое сливок – положительный результат, отрицательная реакция характеризуется синим окрашиванием пробы с желтоватым слоем сливок.

- *Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)* сущность которой заключается в склеивании эритроцитарного антигена под действием антител и образования осадка в виде зонтика. Ставят РНГА по типу луночной, в лунках плексигласовых панелей или микрометодом в планшетах или по типу капельной на предметном стекле.

Учитывают луночную РНГА в крестах спустя 45 – 60 мин выдерживания при комнатной температуре:

- *четыре креста* – (#) соответствует 100%-ной агглютинации, выпадает осадок в виде зонтика с кружевными краями;
- *три креста* – (+++) – 80%-ная агглютинация, осадок зонтик с округлыми краями;
- *два креста* – (++) – 50%-ная агглютинация, осадок диск и пунктик;

- отрицательная – осадок пунктик.

Капельную РНГА применяют для выявления носителей сальмонелл среди ремонтного молодняка и родительского стада кур, учитывают через 3 – 5 мин :

- *четыре креста* – (#), когда крупные, коричневые хлопья;

- *два креста* – (++) – мелкие хлопья.

- отрицательная – нет хлопьев.

• *Реакция торможения гемагглютинации (РТГА), син. реакция задержки гемагглютинации (РЗГА)* ставят по типу луночной в лунках плексиглассовых панелей или микрометодом в планшетах, широко применяют для выявления гемагглютинирующих вирусов и антител против гемагглютинирующих вирусов. Учитывают в крестах:

- *четыре креста* – (#) соответствует 100%-ной задержки гемагглютинации, выпадает осадок из эритроцитов в виде пунктика или узкого колечка;

- *два креста* – (++) – 50%-ная задержка гемагглютинация, осадок диск и пунктик;

- отрицательная – (-) – осадок из эритроцитов в виде зонтика.

• *Реакция Кумбса (РК)* позволяет выявить неполные антитела. Метод основан на применении антиглобулиновой сыворотки, служащей посредником для соединения неполных антител, фиксированных на эритроцитах барана. Применяют РК для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота в бактериальном варианте.

В медицине используют для выявления неполных антител и диагностики резус – конфликта, аутоиммунных заболеваний (красная волчанка, ревматоидный полиартрит и др.).

Вопросы для обсуждения

1. Сущность, методика постановки, учета РА.
2. Современные разновидности РА.
3. Виды и категории иммунитета.

ТЕМА 10

Разновидности реакции преципитации. Реакция связывания комплемента (РСК)

Цель занятия. Разобрать сущность, методику постановки и учета разновидностей реакции преципитации. Разобрать сущность, методику постановки и учета РСК.

Оборудование и материалы. Пробирки, штативы Флоринского, пипетки, физраствор, сыворотки крови, диагностикумы, компоненты для постановки реакции Асколи.

Задание для самостоятельной работы студентов. 1. Поставить и учесть реакцию Асколи, РСК для диагностики бруцеллеза по методике Вассермана.



Рис. 12. Результат реакции Асколи

Таблица 20 – Результат РСК

| Компоненты | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Испытуемая сыворотка | | | | | | | | |
| Антиген, рабочая доза | | | | | | | | |
| Комплемент, рабочая доза | | | | | | | | |
| Физраствор | | | | | | | | |
| Выдерживают 37 ⁰ С – 30 мин | | | | | | | | |
| Гемсистема | | | | | | | | |
| Выдерживают 28 ⁰ -30 мин | | | | | | | | |
| Результат | | | | | | | | |

Реакция преципитации

Реакция преципитации (осаждения) заключается в осаждении антигена под действием антител. Реакция характеризуется следующими особенностями:

- высокой чувствительностью и специфичностью;
- в реакции используют только растворимый антиген, т.е. экстракт возбудителя в электролите;
- реакцию ставят с концентрированными сыворотками, определяя вид, вариант возбудителя, а также с растворимым антигеном с целью обнаружения в исследуемой сыворотке специфических Ig;
- положительный результат оценивают одним знаком плюс.

Реакцию преципитации ставят по типу:

- *Кольцепреципитации* в пробирках Уленгута методом наслаивания или подслаивания, с использованием равных объемов сыворотки и антигена. Широко применяют реакцию Асколи для выявления антигена возбудителя сибирской язвы в кожевенном сырье, шерсти, патологическом материале, ставят по типу кольцепреципитации, используя стерильный экстракт изучаемого материала. А.Асколи разработал кольцепреципитацию в 1902 году.

Кольцепреципитацию для определения вида крови, мяса, тканей называют реакцией Уленгута.

Положительная кольцепреципитация характеризуется образованием мутного, белого кольца на границе двух жидкостей.

- *Флокуляции*, когда компоненты (антиген и сыворотку) в пробирке смешивают, в положительных случаях образуется осадок. Широко применяют реакцию флокуляции по Кану (разработана в 1921 г.) в медицине для обнаружения специфических Ig при третичном и четвертичном сифилисе. С помощью флокуляции можно выявить токсин в исследуемом материале и определить активность анти-

токсических сывороток. Разновидностью флоккуляции является *реакция нейтрализации*.

● *Реакция нейтрализации* – эффективный тест для определения типа токсина и активности антитоксических сывороток. Ставят в два этапа. Вначале готовят разведения сывороток, затем смешивают равные объемы экстракта токсина и сывороток, выдерживают в термостате 1-2 часа при 37⁰ С. На втором этапе реакции смесь вводят лабораторным животным (белым мышам, морским свинкам), по 2 животного на смесь каждого разведения сыворотки. Животные, получившие смесь из пробирок, где произошла нейтрализация остаются живыми. Наименьшее количество сыворотки, нейтрализующее действие токсина, принимают за единицу активности (АЕ) антитоксической сыворотки.

● *Реакции диффузной преципитации в агаровом геле (РДП), реакции иммунной диффузии (РИД)*, когда компоненты реакции антиген, сыворотки вносят в лунки агарового геля, выдерживают в течение 48 – 72 часов при комнатной температуре. Положительный результат – серые полосы между лунками с компонентами. Широко применяют РИД для выявления специфических Ig в сыворотке крови крупного рогатого скота при бруцеллезе и лейкозе. РДП применяют для изучения антигенной структуры возбудителей.

● *Иммуноэлектрофореза* – РДП в электрическом поле, применяют для изучения антигенной структуры возбудителей, ставят на пластинах с агаровым гелем. На месте встречи антигенов и антител образуются серые полосы.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) – сложная двухфазная реакция взаимодействия антигена, антитела и комплемента с выявлением результатов с помощью гемолиза.

В первую фазу взаимодействуют сыворотка обследуемого животного, антиген и комплемент, если в сыворотке содержатся Ig, специфичные антигену, то образуется комплекс, к которому присоединяется комплемент весь или частично. Если сыворотка обследуемого животного не содержит специфических Ig, то комплекс не образуется и комплемент остается свободным.

Во вторую фазу реакции добавляют эритроциты барана и гемолитическую сыворотку (гемсистему), чтобы выявить состояние комплемента. Если комплемент связан полностью, то эритроциты не разрушаются и оседают на дно пробирки – положительный результат - (#); если 80% комплемента связано: в пробирке розовая жидкость, на дне эритроциты – (+++); если в пробирке красная жидкость и осадок из эритроцитов на дне – (++) ; если комплемент полностью свободен отмечают гемолиз, в пробирке красная прозрачная жидкость – отрицательный результат – (-).

Для постановки РСК необходимы следующие компоненты и посуда: испытуемая сыворотка, антиген, физиологический раствор, градуированные пипетки, пробирки Флоринского, штатив Флоринского, комплемент – лиофильно высушенная сыворотка крови морской свинки, гемолитическая сыворотка, 3%-ная взвесь эритроцитов барана.

Впервые белок сыворотки крови человека, лабораторных животных, вызывающий гемолиз эритроцитов обнаружил Х. Бюхнер и обозначил его как алексин, в 1906 году А.Вассерман уточнил гемолитические и бактериолитические свойства белка и обозначил его как комплемент, установил его высокий титр в сыворотке крови морской свинки. Комплемент для РСК выпускает Щелковский биокомбинат.

Гемолитическую сыворотку выпускают специально для РСК и готовят гипериммунизацией кроликов эритроцитами барана (Армавирская биофабрика).

Постановки реакции предшествует подготовительный период, в котором определяют рабочие дозы компонентов, инактивируют комплемент исследуемых сывороток, прогревая при 54⁰ С в течение 30 мин.

Впервые РСК разработали Ж Борде, О. Жангу в 1901 году, А Вассерман усовершенствовал реакцию для широкого лабораторного исследования с целью выявления сифилисных Ig в сыворотке крови человека.

Постановку главного опыта классической РСК по методике А. Вассермана проводят в восьми пробирках, из которых две опытные и шесть контрольных.

Таблица 21 - Методика постановки главного опыта РСК

| | | | | | | | | |
|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| Компоненты | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Испытуемая сыворотка | 0,5 | 0,5 | 0,5 | | | | | |
| Антиген, рабочая доза | 0,5 | 0,5 | - | 0,5 | | | | |
| Комплемент, рабочая доза | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Физраствор | - | - | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 1,25 | 1,0 | 0,5 |
| Выдерживают 37 ⁰ С – 30 мин | | | | | | | | |
| Гемсистема | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Выдерживают 28 ⁰ 30 мин | | | | | | | | |

Учет РСК начинают с контролей, которые оценивают по реакции гемолиза, если контроли сработали, тогда дают оценку РСК в опытных пробирках, положительный результат учитывают в крестах.

РСК ставят с целью:

- *обнаружения антител у обследуемых животных, используя заведомо известный антиген, широко применяют для серологической диагностики бруцеллеза, листериоза;*
- *определения серотипа или варианта вируса ящура, используя заведомо известные сыворотки.*

Если вторую фазу РСК проводят при температуре $5 - 10^{\circ}\text{C}$ в течение 12 – 16 часов, то тогда ее называют РДСК (реакцией длительного связывания компонента). РДСК более чувствительна, чем РСК и рекомендована для серологической диагностики бруцеллеза у мелкого рогатого скота.

Методика постановки главного опыта РСК для серологической диагностики бруцеллеза

Главный опыт при массовых исследованиях ставят в двух пробирках, в первую наливают 0,04 мл испытуемой сыворотки и 0,16 мл физраствора, во вторую – 0,6 мл физраствора и проводят инактивирование сывороток при $60 - 62^{\circ}\text{C} - 20$ мин. Добавляют в первую пробирку антиген и комплемент по 0,2 мл, выдерживают при $37^{\circ}\text{C} - 20$ мин. Затем в первую и во вторую пробирки вносят по 0,4 мл гемсистемы, выдерживают при 37°C в течение 20 мин.

Учет с контрольной пробирки: не должно быть гемолиза, тогда учитывают результат в опытной пробирке. Если получены положительные результаты, сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и 1:10.

ТЕМА 11

Патогенные кокки

Цель занятия. Ознакомить студентов с основными свойствами возбудителей стафилококкозов, стрептококкозов, этапами лабораторной диагностики и биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Взвеси *S.aureus*, *St.agalactia*, бульонные и агаровые культуры *S.aureus*, *St.agalactia*. Мазки *St.pneumonia*, *St.equi*. Результаты тестов по определению факторов вирулентности *S.aureus*: плаз-

мокоагуляция, лецитиназная, гемолитическая активность. Краски и реактивы для окрашивания мазков по Граму.

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести бактериоскопию по Граму взвесей *S.aureus*, *St.agalactia*, результат зарисовать. 2. Познакомиться с культуральными свойствами *S.aureus*, *St.agalactia*, результатами тестов по определению вирулентности *S.aureus*. 3. Познакомиться с биологическими свойствами патогенных стрептококков, лабораторной диагностикой, биопрепаратами для профилактики и лечения стафилококкозов и стрептококкозов.

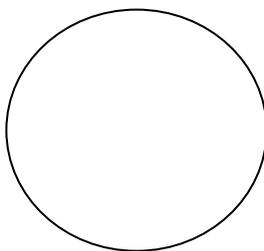
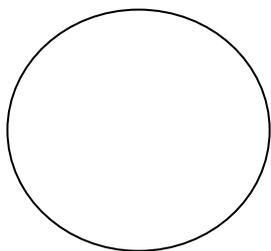


Рис. 13. Морфология *S.aureus* Рис. 14. Морфология *St.agalactia*

Лабораторная диагностика стафилококкозов

Стафилококки относят к *отделу Firmicutes, порядку Eubacteriales, семейству Micrococcaceae, роду Staphylococcus*, в который по классификации Байрд-Паркер входят три вида:

- *Staphylococcus aureus*;
- *Staphylococcus epidermidis*;
- *Staphylococcus saprophyticus*.

Первых представителей рода выделили Кох (1878) и Пастер (1880) из очагов гнойных поражений у человека.

Staphylococcus aureus- золотистый стафилококк возбудитель стафилококковой инфекции (стафилококкоза),

проявляющейся 120 клиническими формами, которые подразделяют на заболевания трех групп:

- местные (пиодермии, нагноение ран);
- системные (пневмонии, артриты, остеомиелиты, маститы, отравления);
- генерализованные (стафилококковый сепсис, протекает на фоне инфекционно-токсического шока, стафилококкоз).

Источник инфекции – носители, пищевые продукты, корма, предметы ухода.

Способ заражения:

- раневой;
- алиментарный.

Стафилококкоз чаще возникает у молодняка птиц, пушных зверей, ослабленных животных. Стафилококковая септицемия способствует алергизации организма по типу накопления иммунных комплексов и развитию ИДС.

Исследования проводят в соответствии с Методическими указаниями по лабораторной диагностике стафилококкоза №432-3 от 29.07.1987 г.

Материал для исследований:

- *клинический* – *экссудат* (возбудитель вызывает гнойное воспаление);
- *патологический* – *внутренние паренхиматозные органы погибших*.

В лаборатории проводят:

- *бактериоскопию исследуемого материала*, обнаруживают грамположительные стафилококки;
- *бактериологическое исследование* делают посеvy на элективные питательные среды, выделяют чистую культуру, идентифицируют по морфологическим, культуральным и биологическим свойствам, представленным в таблице.

Таблица 22 - Дифференциация стафилококков по биологическим свойствам

| Признаки | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
|-------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Плазмокоагуляция | + | - | - |
| Образование лецитиназы | + | - | - |
| Гемолиз на кровяном ПА | + | - | - |
| Ферментация глюкоза | + | + | - |
| Ферментация маннита | + | - | + |
| Чувствит. к новобиоцину | Ч | Ч | У |

Плазмокоагуляцию – коагулазный тест определяют в реакции плазмокоагуляции посевом бульонной или агаровой культуры в плазму кролика, разведенную 1:5 или 1:10, учет спустя 1,2,3 и 24 часа выдерживания пробирок в термостате при 37⁰ С. Наличие желеобразного или плотного сгустка указывает на положительный результат реакции.

Способность стафилококков продуцировать *лецитиназу* изучают посевом на желточный агар или ЖСА. При росте культур с *лецитовителазной активностью* вокруг колоний формируется зона помутнения (накопление фофорилолина) или расплавления среды.

Ферментацию глюкозы определяют посевом на среду Гисса с глюкозой, а *маннита* на среду Гисса с маннитом, содержащую вазелиновое масло.

Чувствительность к *новобиоцину* – методом серийных разведений.

Биопрепараты и АБП для лечения стафилококкозов

У резистентных организмов есть устойчивость против возбудителя за счет физиологических (целостность кожи), гуморальных (комплемента, лизоцима, пропердина, лейкинов, плакинов, β -лизинов) факторов.

После переболевания формируется слабый антитоксический иммунитет.

В медицине для создания антитоксического иммунитета используют стафилококковый анатоксин.

Для профилактики стафилококкоза птиц – стафилококковой анатоксин.

При тяжелом и хроническом течении в медицине применяют антистафилококковый иммуноглобулин.

Основу терапевтических мероприятий у больных составляет адекватная антибактериальная терапия с использованием АБП, к которым чувствителен возбудитель.

Биологические свойства стрептококков

Стрептококки относят к отряду Firmicutes, семейству Streptococcaceae, Streptococcus, в составе рода 20 видов, которые имеют подвиды, полезных, сапрофитов и возбудителей.

Современная классификация, предложенная R. Lancefield (1933) на основе группоспецифических углеводов (ПС) в клеточной стенке, подразделяет стрептококки на 17 серогрупп, обозначаемых латинскими буквами в порядке алфавита (А-О).

Виды патологии, биологические свойства стрептококков, биопрепараты

| Признаки | S.pyogenes | S.galactia | S.equi | | S.pneumonia | S.suis | S.faecalis |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| | | | S.equi subsp.zoepidemi cus | S.equi subsp.equi | | | |
| Антигенная специфичность | A | B | C | C | Не классир | D, R, S | D |
| Патология | Пиодермия, эндометри- ты, пневмо- нии | Маститы, эндометри- ты коров, полиартрит ягнят | Стрептокок- коз (септи- мия, арт- риты, арт- риты молодняка животных и птиц). | Мыл – гной- но- катаральный ринит, фа- рингит, лимфаденит | Стрептокок- коз (септи- цемия, пневмония, артриты мо- лодяка жи- вотных) | Респиратор- ные заболе- вания, ме- нингиты, артриты и артрозы по- росят | Энтерококковая инфекция (га- стро- энтероколит, септицемия, токсемия) |
| Источник инфекции | Носители, больные, контаминированные объекты внешней среды | | | | | | |
| Способы заражения | Раневой, контактный, | Контакт- ный | Контактный алиментарный | Контактный, алиментар- ный, азотенный | Контактный, алиментар- ный, азотенный | Контактный, алиментар- ный, азотенный | Алиментарный |
| Морфологи- ческие свойства | Кокки сферической формы, организованные в короткие цепочки | Овальной формы, мелкие клетки, парами или це- почками | Крупные, овальные кокки, рас- полагаются парами, во- круг цепочек | Мелкие овальные кокки, рас- полагаются парами, во- круг капсула | Длинные или короткие цепочки коков | Кокки сфериче- ской формы, организо- ванные в ко- роткие цепочки | |
| Культураль- ны свойства | На МПБ S.pyogenes образует рыхлый осадок, остальные виды – помутнение. На сывроточном и кровавом ПА мелкие, выуклые серые колонии | | | | | | |
| Гемолиз | β | β | α | β | α | β | β |

| | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Ферменты, руют субстраты: | Лактоза, салицил, галактоза | Глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, салицин | Лактоза, трегалоза | Лактоза, сорбит | Лактоза, мальтоза | Лактоза, инулин | Лактоза, салицил, трегалоза | Лактоза, сорбит, маннит |
| Факторы вирулентности | Эндотоксин. Ферменты: фибринолизин, ДНК-аза, гиалуронидаза, экзотоксин: лейкоцидин, гемолизин, у капсульных – капсула, адгезивные свойства - | | | | | | | |
| Устойчивость | Экссудат 3-4 недели, 80° С-30мин | Экссудат 2-3 мес, 85° С 30 мин | Экссудат 2-3 мес, 85° С 30 мин | Экссудат 3-4 недели, 55° С-10мин | Гной-6 мес., Навоз 1 мес., 85° С-30мин | В помещении 3-4 недели, 85° С-30 мин | В помещении 3-4 недели, 85° С-30 мин | Фекалий 1 мес, 85° С-30 мин |
| Дезосредства | 2%-ный гидроксид натрия, 10%-ный ОСГ за 10-15 мин | | | | | | | |
| Материал для исследований | Гной | Экссудат | Экссудат | Патологический | Гной | Патологичес. | Патологич | Фекалий, патологич |
| Лабораторная диагностика | Бактериоскопия по Граму и Романовскому-Гимза, бактериологическое исследование, идентификация по морфологическим, культуральным, ферментативным свойствам, биопроба на белых мышах или кроликах при внутрибрюшинном заражении, гибель в течение 3-ех суток. | | | | | | | |
| Биопрепараты | <p>1. Формолваксовая вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза поросят ассоциированная инактивированная. Вакцина инактивированная против диплококковой септицемии молодняка (против <i>Stt.rhizophonia</i>).</p> <p>3. Сыворотка против диплококковой септицемии молодняка.</p> <p>4. Инактивированная вакцина против мыга лошадей с иммуномодулятором.</p> | | | | | | | |
| Препараты для лечения | Стартовые АБП: пенициллин, ЦС-группа, хинолоны, сульфаниламиды. Резерв – хлорамфеникол, тилозин | | | | | | | |

Лабораторная диагностика стрептококкозов животных представлена в Методических указаниях по лабораторной диагностике стрептококкозов животных от 1990 г.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства стафилококков.
2. Лабораторная диагностика стафилококкозов, био-препараты, АБП.
3. Классификация патогенных стрептококков, биологические свойства.
4. Лабораторная диагностика стрептококкозов, био-препараты, АБП.

ТЕМА 12

Лабораторная диагностика сибирской язвы, биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с основными свойствами возбудителя сибирской язвы, этапами лабораторной диагностики и биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Мазок с натуральным возбудителем сибирской язвы. Компоненты для реакции Асколи. Образцы биопрепаратов для диагностики, профилактики и лечения сибирской язвы.

Задание для самостоятельной работы. 1. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителя сибирской язвы, методами лабораторной диагностики. 2. Освоить методику постановки реакции Асколи. 3. Познакомиться с биопрепаратами для диагностики, профилактики, лечения сибирской язвы.

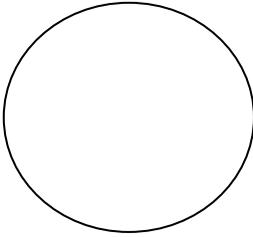


Рис. 15. Возбудитель сибирской язвы



Рис. 16. Положительная и отрицательная реакция Асколи

Биологические свойства возбудителя сибирской язвы

Сибирская язва (Anthrax) – острая инфекционная болезнь, характеризующаяся септициемией, тяжелой интоксикацией, а также образованием подкожных отеков (карбункулов).

Назвал болезнь С.С. Андриевский (1789), впервые возбудителя выделил R. Koch (1876).

Восприимчивы: крс (молодняк), северные олени, мрс, лошади, человек, свиньи.

Источник инфекции:

- больные, их кровь, моча, слюна;
- погибшие, много возбудителя в истечениях трупа;
- почва, содержащая возбудителя повсеместно.

Способ заражения:

- алиментарный;
- аэрогенный;
- трансмиссивный;
- раневой.

Чаще животные заражаются на пастбище, вспышки июнь-сентябрь.

Возбудителя *Bacillus anthracis* относят к отделу Firmicutes, семейству Bacillaceae, роду Bacillus.

Морфологические свойства. Грамположительная крупная палочка, образует овальную спору внутри клет-

ки, формирует цепочки, окружена капсулой. В крови погибших образует короткие цепочки, в культурах – длинные цепи из множества клеток. Хорошо красится ориентировочно. Имеет факультативное дыхание, тяготеет к анаэробным условиям.

Культуральные свойства. Хорошо растет на основных питательных средах:

- МПБ – осадок – «комочек ваты»;
- МПА – R- формы крупных серо-белых колоний, поверхность шероховатая (сплетение нитей);
- МПЖ – опрокинутая елочка.

Биохимические свойства. Расщепляет глюкозу, фруктозу, мальтозу, крахмал, плавит желатин, свертывает молоко.

Факторы вирулентности:

- капсула;
- экзотоксин из 3 компонентов;
- ферменты патогенности (Фибринолизин, лецитиназа).

Антигенные свойства. Возбудитель имеет:

- капсульный антиген – полипептид;
- соматический антиген ПС природы;
- экзотоксин из 3 термолабильных компонентов.

Возбудитель, выделенный в разных странах одинаковый.

Устойчивость. Вегетативные формы слабо устойчивы, в трупах погибают через 2-3 суток, 100°C – мгновенно, -10°C – 24 дня.

Споры устойчивы в почве хранятся 80 лет и больше. Кипячение выдерживают в течение 15-30 мин, 1,2 атм – 10 мин. Формалин 2%-ный уничтожает споры за 10-15 мин, 3%-ная перекись водорода – 1 час, 10%-ный гидроксид натрия – 2 часа.

Под влиянием неблагоприятных факторов появляются L-формы.

Возбудитель чувствителен к пенициллину, ХТЦ, хлорамфениколу.

Лабораторная диагностика сибирской язвы

Лабораторную диагностику проводят согласно Методических указаний (МУ) по лабораторной диагностике сибирской язвы от 01.09. 1986г. и МУ по лабораторной диагностике сибирской язвы. Роспотребнадзора 2009г.

Материал только патологический: ухо погибшего или селезенка убитого животного.

1. *Бактериоскопия мазков-отпечатков*, окрашенных ориентировочно или по Граму. Мазки фиксируют в смеси спирта 80 мл и пергидроля 20 мл в течение 30 мин. Обнаруживают крупные палочки, цепочками, окруженные капсулой.

2. *Бактериологическое исследование*: делают посевы материала на основные питательные среды и сывороточный ПА и МПБ. Выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным свойствам, чувствительности к диагностическому сибирезвенному бактериофагу (К-ВИЭВ, «Гамма» -МВА), чувствительности к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») с подтверждением вирулентности возбудителя биопробой.

3. *Биопроба* проводят обязательно, если материал с признаками гниения. Заражают 4 белые мыши (0,2мл) и 2 морских свинок по 0,5 мл подкожно в области живота. Гибель в течение 3 суток, из погибших выделяют чистую культуру.

4. *Реакция Асколи*, используя диагностическую преципитирующую сыворотку и экстракт шкуры, шерсти – фильтрнат после 15-минутного кипячения.

5. *Люминесцентная микроскопия*, когда мазки обрабатывают сибирезвенной люминисцирующей сывороткой.

Иммунитет и биопрепараты. У больных стойкий,

пожизненный антитоксический иммунитет. У крс, мрс, лошадей плановая вакцинация. Применяют вакцины:

- живая сибиреязвенная вакцина СТИ, на основе бескапсульного штамма СТИ, выделенного в 1940 году Тамариным и Гинсбургом, выпускают сухую и жидкую вакцины;
- живая сибиреязвенная вакцина из штамма №55, выделенного в 1963 году от погибшего поросенка, выпускают сухую и жидкую вакцины;
- ассоциированная живая вакцина против сибирской язвы (штамм №55) и эмкара (штамм №1/14) жидкая;
- сыворотка противосибиреязвенная лошадиная для профилактики и лечения;
- глобулин противосибиреязвенный из сыворотки крови лошади.

Препараты для лечения

Больных при остром течение заболевания лечат, применяя:

- противосибиреязвенную сыворотку;
- пенициллин внутривенно два раза в день;
- внутримышечное введение комбинаций антибиотиков тетрациклин и стрептомицин, тетрациклин и эритромицин, тетрациклин и ампициллин.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства сибирской язвы.
2. Лабораторная диагностика сибирской язвы, био-препараты и АБП.

ТЕМА 13
**Лабораторная диагностика туберкулеза,
паратуберкулеза**

Цель занятия. Изучить биологические свойства возбудителей, методы лабораторной диагностики туберкулеза, паратуберкулеза.

Оборудование и материалы. Образцы питательных сред для культивирования возбудителей. Мазки клинического материала, содержащие возбудителя туберкулеза. Биопрепараты для аллергической диагностики туберкулеза. Противотуберкулезные препараты для лечения человека. Таблицы по лабораторной диагностики туберкулеза, паратуберкулеза.

Задание для самостоятельной работы. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителей туберкулеза, паратуберкулеза. Познакомиться с биопрепаратами для диагностики туберкулеза. Освоить бактериоскопию мазков по Цилю-Нильсену.

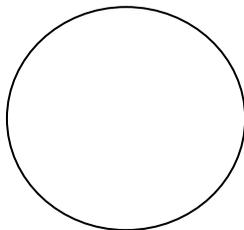


Рис. 17. Возбудитель туберкулеза

Биологические свойства возбудителей туберкулеза

Туберкулез инфекционное заболевание с поражением внутренних органов, преимущественно легких, с интоксикацией и аллергизацией организма.

Название болезни от латинского tuberculum – бугорок. Болеют все виды животных и человек, широко распространено заболевание у крупного рогатого скота, свиней, пушных зверей (норки), болеет домашняя птица в индосекторе и дикие.

В месте проникновения возбудителя в организме возникает воспалительный очаг и сенсбилизация – *первичный аффект*, затем специфическое воспаление лимфатического узла – *первичный комплекс*, затем идет образование очага – *грануломы*, содержащей некротическую ткань и много возбудителя. При заживлении очага вокруг формируется капсула из фиброзной ткани, а внутри накапливаются соли Ca^{++} , возбудитель замуровывается и погибает. Чаше заболевание прогрессирует, очаги распадаются и возбудитель распространяется по организму (диссеминирует) с образованием множества очагов – гранулом в разных органах. Диссеминированный туберкулез вызывает гибель птиц, норок, редко свиней. У скота возбудитель поражает только лимфатические узлы, редко легкие, вымя, но больные активно выделяют возбудителя с мокротой, молоком, фекалиями.

Источник инфекции – больные. Способ заражения: *аэрогенный, алиментарный*.

Возбудители заболевания микобактерии, относят к отделу Firmicutes, семейству Mycobacteriaceae, роду Mycobacterium.

Циркулирует несколько видов возбудителя:

- *Mycobacterim tuberculosis*, человеческий вид – возбудитель туберкулеза человека и всех видов животных, первооткрывать – Р Кох в 1882 году;

- *M. bovis*, бычий вид – возбудитель заболевания у крс, свиней, норок, лошадей, человека (5% заболевших);

- *M. avium*, птичий вид – возбудитель для кур, индеек, свиней, впервые был выделен Н.Ф. Гамалея, Штраусом в 1891 году.

К роду *Mycobacterium* относят атипичные микобактерии, широко распространены в окружающей среде, много в торфе. Могут персистировать в организме, вызывать лимфадениты и всегда сенсibilизировать организм.

Морфологические свойства. Кислото-, спиртоустойчивые палочки, окрашиваются по Цилю-Нильсену в розовый цвет, имеют мощную клеточную стенку, в составе которой много ЛПС, масса клеточной стенки составляет 30,6 – 38,9% массы клетки. У видов есть морфологические отличия:

- человеческий вид – тонкие, извилистые палочки;
- бычий вид – короткие толстые, зернистые;
- птичий вид – длинные палочки, располагаются цепочками.

Все возбудители имеют факультативное дыхание, тяготеют к аэробным условиям, поэтому чаще поражают легкие.

Культуральные свойства. Растут только на элективных средах: глицериновый бульон, глицериновый картофель (Ру, Нокар, 1887), ФАСТ-ЗЛ, Левинштейн – Иенсена.

Разные виды имеют особенности роста:

- *Mycobacterium tuberculosis* – толстая, складчатая пленка, сухие бородавчатые колонии;
- *M. bovis* – нежная пленка, мелкие, зернистые серовато-белые колонии;
- *M. avium* – слизистая пленка, крупные золотистые или серовато-белые колонии.

Растут медленно 4-5 недель, птичий вид за 10 – 15 суток.

Факторы вирулентности:

- *эндотоксин* вызывает распад клеток (воспаление с некрозом), интоксикацию организма, повышение температуры тела, сенсibilизацию организма к возбудителю по типу ГЗТ;

- *жирные кислоты* клеточной стенки усиливают действие эндотоксина;

- *ПС-компоненты* клеточной стенки обуславливают корд-фактор - образование скоплений возбудителя в организме, т.е. очагов.

Антигенная структура. Содержит антигенные компоненты. Протективным действием обладает полисахариднобелковый комплекс.

Устойчивость. Возбудители устойчивы в окружающей среде:

- *Mycobacterim tuberculosis* в почве - 7 месяцев;

- *M. Bovis* в навозе - 4 года, в молоке - 10 суток, масле – 300 дней, сыре – 200 дней;

- *M. avium* в почве - 10 лет, в трупах птиц до 12 месяцев.

Устойчив к дезинфектантам, лучше использовать смесь 3%-ного формальдегида и 3%-ного гидроксида натрия. Чувствителен к УФЛ. Имеет R –плазмиду, образует L – формы.

Лабораторная диагностика туберкулеза

Диагностику заболевания проводят согласно Наставления от 2002 года, включает: аллергическое, бактериоскопическое, бактериологическое исследования и биопробу.

- *Аллергическую пробу* на туберкулез называют *туберкулинизацией*, это ведущий прижизненный метод диагностики заболевания, когда аллерген – ППД туберкулин вводят животным внутрикожно, у больных возникает воспаление. У крс применяют ППД млекопитающих, учет через 72 часа, у больных увеличение кожной складки на 3 и более мм. Свиньям вводят ППД млекопитающих и ППД птичий, учет через 48 часов. Курам, индейкам родительских стад применяют ППД птичий, вводят в бородку, учет через 36 часов.

Аллергическое исследование на туберкулез – плано-

вое исследование у крс, племсвиной, прородительских стад кур, индеек, гусей 2 раза в год (индивидуальный сектор – один раз в год.

В случае выявления положительно реагирующих животных поступают следующим образом:

- исследуют повторно офтальмо- или внутривенной пробой, реагирующих положительно, подвергают убою, комиссионно проводят патологоанатомическое исследование, если обнаруживают очаги с некрозом, диагноз подтверждают, если только увеличение лимфоузлов – направляют на лабораторное исследование;

- при отсутствии реагирующих на офтальмо- или внутривенную пробы, всех животных через 30 – 45 дней проверяют симультанной аллергической пробой, когда одновременно вводят ППД млекопитающих и КАМ-аллерген (белковолипидный комплекс из атипичных микобактерий), если реакция более выражена на КАМ, стадо считают благополучным.

- *Лабораторное исследование* включает бактериоскопию, бактериологическое (культуральное) исследования и биопробу.

Материал для исследования – лимфоузлы положительно реагирующих животных, трупы птиц.

- *бактериоскопическое* исследование предусматривает микроскопирование мазков-отпечатков из лимфоузлов, очагов поражения, окрашенных по Цилю – Нильсену, обнаруживают скопление палочки розового цвета;

- *бактериологическое* (культуральное) исследование, когда материал измельчают, дают контакт с 3 -5% серной кислоты, отмывают, делают посеvy на элективные питательные среды, выращенную культуру идентифицируют по культуральным, морфологическим, вирулентным свойствам или в ПЦР.

Идентификацию возбудителей по вирулентным свойствам предложил Р. Кох.

Таблица 23 - Определение вида возбудителя туберкулеза с помощью биопробы

| Вид возбудителя | Вирулентность для лабораторных животных | | |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | морские свинки | кролики | куры-молодки |
| M. tuberculosis. | Генерализов. туберкулез | Очаги в легких | Живы |
| M. bovis | Генерализов. туберкулез | Генерализов. туберкулез | Живы |
| M. avium | Живы | Туберкулезный сепсис | Генерализов. туберкулез |

- *биопроба*, когда взвесью патматериала заражают 3 морские свинки 1 -3 мл подкожно, если положительная реакция, то в месте инъекции уплотнение, некроз, увеличение лимфоузлов, исхудание, гибель, срок наблюдения 3 месяца.

Иммунитет. Ig не защищают организм от возбудителя. Важное значение имеют клеточные факторы, их активность способствует инкапсулированию очага и петрификации.

Биопрепараты:

- вакцина БЦЖ на основе ослабленного штамма M. Bovis, применяют для профилактики туберкулеза щенкам норок, человека (новорожденным на 5 -7 день, в 7, 12, 17 лет). Вакцина разработана Калметом, Гереном в 1924 году;

- ППД туберкулин млекопитающих для аллергической диагностики у крс, свиней, норок;

- ППД туберкул птичий для аллергической диагностики у птиц, свиней;

- КАМ- аллерген для дифференциации персистирования атипичных микобактерий от инфицирования возбудителем туберкулеза крс.

Больных не лечат, выбраковывают.

В медицине лечебные препараты разделяют на препараты первого ряда и альтернативные. Первый ряд: изониазид, этамбутол, стрептомицин, пипразинамид, рифампи-

цин. Альтернативные: ПАСК, канамицин, этонамид. Курс химиотерапии – 1 год и более.

Биологические свойства возбудителя паратуберкулеза

Паратуберкулез – хроническое заболевание крупного рогатого скота (реже овец) с поражением тонкого отдела кишечника, диареей и прогрессирующим исхуданием.

Возбудитель поражает солитарные фолликулы, вызывая пролиферативное воспаление слизистой тонкого кишечника, от чего наблюдают утолщение слизистой, складчатость, выключение всасывающей, ферментативной, секреторной функции, диарею, интоксикацию, истощение, гибель от кахексии и интоксикации.

Источник: больные и носители.

Способ заражения алиментарный.

Заболевание распространено в северо-западных районах, известно в СССР с 1926 года (первый описал К.Г. Боль).

Возбудитель относят к отделу Firmicutes, семейству Mucobacteriaceae, роду Mucobacterium и виду Mucobacterium paratuberculosis. Открыт возбудитель Ионе в 1895 году.

Морфологические свойства. Мелкая кислото-, спиртоустойчивая палочка, располагается группами, имеет факультативное дыхание.

Культуральные свойства. Растет медленно от 6 недель до 7 месяцев на элективных питательных средах:

- среде Левенштейна с образованием мелких серовато-желто-белых колоний сосочков;
- среде Вишневского с образованием нежной беловато-серая пленка.

Лучше растет с добавлением к средам баккормилки – убитого экстракта Mucobacterium phlei.

Факторы вирулентности:

- *клеточная стенка*, обеспечивающая пенетрирование возбудителя внутрь фагоцитов, пролиферацию, его накопление в подслизистом слое и лимфоузлах;

- эндотоксин вызывает воспаление по месту локализации возбудителя, общую интоксикацию организма, ГЗТ.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Установлено антигенное родство с *M. avium*.

Устойчивость. Длительно сохраняется в навозе 10 – 12 месяцев, в воде 8-10 месяцев, в моче 7 суток. 10%-20%-ные растворы хлорной извести, 5%-ные раствора формалина, фенола, лизола уничтожают возбудителя за несколько часов.

Лабораторная диагностика паратуберкулеза

Диагностику заболевания проводят по ГОСТ 26073-84, *Наставлению по диагностике паратуберкулеза от 05.01.2001 г.*, которая включает

- серологическое исследование;

- лабораторное исследование.

- *Серологическую диагностику* проводят с помощью РСК (положительный титр 1:10) с экстрактом возбудителя и сыворотками крови обследуемых;

- *Лабораторное исследование* проводят, используя клинический (комочки слизи или кровяные сгустки фекалий) и патологический материал (брыжеечные лимфатические узлы, участки пораженного кишечника), включает бактериоскопию по Цилю-Нильсену и бактериологическое исследование.

Для *аллергического диагностирования* паратуберкулеза у овец применяют ППД туберкулин для птиц, у больных через 48 часов воспаление.

Иммунитет. Против возбудителя образуются Ig, которые выявляют с помощью РСК. Иммунитет изучен слабо. Биопрепаратов нет. Лечение больных бесперспективно, их выбраковывают, в помещении проводят дезинфекцию.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства возбудителей туберкулеза.
2. Лабораторная диагностика туберкулеза, биопрепараты.
3. Биологические свойства и диагностика паратуберкулеза животных.

ТЕМА 14

Лабораторная диагностика бруцеллеза

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителей, лабораторной и аллергической диагностикой заболевания, биопрепаратами для диагностики, профилактики заболевания.

Оборудование и материалы. Взвеси убитых бруцелл, таблицы, РА, РБП, РСК, РИД готовые к учету. Образцы диагностикумов, вакцин.

Задание для самостоятельной работы. 1. Познакомиться с биологическими свойствами бруцелл, диагностикой заболевания. 2. Провести бактериоскопию взвеси убитых бруцелл, зарисовать. 3. Поставить РА и РБП с сывороткой крови коров. 4. Познакомиться с биопрепаратами для диагностики, профилактики заболевания.

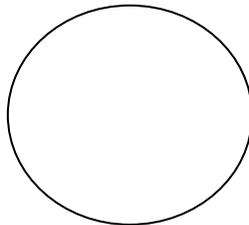


Рис. 18. Бруцеллы

Биологические свойства возбудителей бруцеллеза

Бруцеллез хроническое инфекционное заболевание человека, животных с лихорадкой, поражением опорно-двигательного аппарата, нервной, сердечно-сосудистой, половой систем.

У животных поражается половые органы, суставы, бursы. Клинически у самок мертворожденные, задержание последа, эндометрит, бесплодие, затем поражение суставов, бурс. У самцов поражение суставов и бурс.

Источник больные, которые выделяют возбудителей с мочой, молоком, фекалием, околоплодными водами, последом, кровью.

Способ заражения: контактный, алиментарный, половой.

Возбудителей относят к отряду Gracilicutes, роду Brucella. Впервые возбудителя бруцеллеза выделил Брюс в 1886-87 г.г., в честь ученого возбудителей называют бруцеллами. У животных циркулирует 6 видов бруцелл:

- Brucella melitensis –циркулирует у овец и коз, имеет 3 биовара, 1 и 3 биовары поражают человека;
- Brucella abortus bovis – возбудитель бруцеллеза у крс, известно 9 биоваров к 1, 6, 9 чувствителен человек;
- Brucella suis имеет 5 биоваров, циркулирует у свиней, ко всем биоварам чувствителен человек;
- Brucella canis – возбудитель бруцеллеза собак;
- Brucella ovis – возбудитель инфекционного орхита и эпидидимита баранов, самки не болеют;
- Brucella neotomae – циркулирует у древесных крыс.

Морфологические свойства. Мелкие граммотрицательные коккоподобные палочки, по Козловскому красятся в красный цвет, аэробы. Brucella abortus bovis микроаэрофил.

Культуральные свойства. Растут медленно 30 дней на элективных средах:

- МППБ, МППА (мясопептоннопеченочный бульон и агар);

- ПГТБ и ППГА (печеночноглюкозный глицериновый бульон и агар).

На жидких средах возбудители образуют помутнение с крошковидным осадком, на плотных – выпуклые, прозрачные колонии.

Биохимические свойства. Слабые, все виды образуют сероводород.

Факторы вирулентности.

- *эндотоксин* вызывает воспаление в местах скопления, при циркулировании в крови повышение температуры, интоксикацию, ГЗТ;

- *ферменты проникновения:* гиалуронидаза, нейрамидаза, возбудитель проникает через неповрежденную кожу, слизистые;

- *ферменты патогенности:* уреазы, ее накопление формирует сильный токсикоз с поражением сердечно-сосудистой и нервной системы.

Антигенные свойства. Все виды имеют соматический О-антиген. Два вида соматических антигенов имеют *Brucella melitensis*, *Brucella abortus bovis*, *Brucella suis* и взаимодействуют с S-, R- диагностическими сыворотками. *Brucella canis*, *Brucella ovis* постоянно агглютинируют с R-сывороткой.

Устойчивость. В земле 40 дней, в навозе 120 дней, в воде 5 месяцев. В мясе 320 дней, в шкурах 2 месяца, в шерсти 3-4 месяца. Чувствителен к 2%-ному фенолу, 0,5%-ному лизолу, 2%-ному формалину, 1%-ной хлорамину, 1%-ной соляной кислоте, гибель за несколько мин.

Лабораторная диагностика бруцеллеза

Диагностику бруцеллеза проводят согласно Наставления по диагностике бруцеллеза сельскохозяйственных животных от 2003г.

Диагностика заболевания включает: серологические исследования, аллергическое исследование, бактериологическое исследование, молекулярно-генетическое исследование.

● *Серологические исследования* предусматривают исследование сыворотки крови животных в серологических реакциях:

▪ крс исследуют в РА (диагностический титр 1:200), РБП (розбенгалпробе), РСК, РДСК (положительный титр 1:5, 1:10), РИД с О-полисахаридным антигеном и КР (кольцевая реакция с молоком);

▪ мелкий рогатый скот исследуют в РА (положительный титр 1:100), РСК, РДСК (положительный титр 1:5, 1:10), РИД с О-полисахаридным антигеном;

▪ свиней исследуют в РСК, РДСК (положительный титр 1:5, 1:10);

▪ собак исследуют в РА (положительный титр 1:50), РСК (положительный титр 1:5, 1:10).

● *Кольцевая реакция с молоком* с целью определения благополучия ферм по бруцеллезу крс и проверки молока на рынках, когда к 2 мл молока добавляют 0,1 мл антигена, помещают в термостат или водяную баню 37 -38⁰ С на 1 час и 30 мин выдерживают при комнатной температуре, если в слое сливок появляется синее или красно-вишневое кольцо – положительный результат, если равномерное окрашивание – отрицательный.

● *Аллергическое исследование* проводят у свиней с бруцеллином ВИЭВ, внутрикожной пробой, учет через 24, 48 часов.

● *Бактериологическое исследование* мертворожденного, лимфоузлов положительно реагирующих в серологических реакциях животных, содержимого бурс включает бактериоскопию по Граму мазков отпечатков, затем посеvy. Выделенную чистую культуру, идентифицируют по морфологическим, культуральным, антигенным свойствам, в капельной (пластинчатой) РА с диагностическими S- и R-бруцеллезными сыворотками.

● *Биопроба* (биологическое исследование) проводят

на морских свинках, используя тот же материал, из которого готовят суспензию 1:10 на физиологическом растворе. Морским свинкам вводят 1 мл суспензии, на 15, 25, 40 сутки после заражения берут кровь и сыворотку исследуют в пробирочной РА в разведениях 1:10 до 1:80. Положительно реагирующих умертвляют, из лимфоузлов, селезенки, печени, костного мозга выделяют чистую культуру, идентифицируют. Срок исследования два месяца.

• *Молекулярно-генетическое исследование ПЦР* суспензии патматериала, содержащего гигром, стабилизированной крови, молока, спермы самцов с признаками орхита и эпидидимита, обнаруживают ДНК бруцелл животных.

Иммунитет. Формируется медленно, сопровождается накоплением Ig M и IgG, неполных антител, сенсибилизацией организма к возбудителю. Накопление антител не имеет существенного значения для освобождения организма от возбудителя. Элиминирование возбудителя обеспечивают Т-клетки.

В зонах пастбищного содержания животных, северных оленей целесообразно использовать вакцины для крс:

- живая бруцеллезная вакцина из штамма №19;
- живая бруцеллезная вакцина из штамма №82.

У вакцинированных высокие титры антител, но нет мертворожденных и распространения заболевания.

В овцеводстве используют живую вакцину из штамма Rev-1.

Лечение. Бесперспективно, больных выбраковывают. У человека применяют аминогликозиды разных поколений, рифампицин, тетрациклин, а для профилактики вакцину из штамма №19.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства бруцелл.
2. Лабораторная диагностика бруцеллеза.

ТЕМА 15

Возбудитель туляремии. Патогенные иерсинии

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителя туляремии, лабораторной диагностикой заболевания. Разобрать лабораторную диагностику антропозоонозной чумы, псевдотуберкулеза.

Оборудование и материалы. Таблицы, слайды биологических свойств иерсиний, возбудителя туляремии, биопрепараты.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести учет РА для диагностики бруцеллеза, результат зарисовать. 2. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителя туляремии, лабораторной диагностикой, таблицами, слайдами биологических свойств возбудителей, клиническими признаками изучаемых заболеваний.



Рис. 19. Результаты РА

Биологические свойства возбудителя туляремии

Туляремия – природно-очаговая, зооантропозная болезнь с септициемией, гнойным воспалением лимфоузлов, поражением нервной системы.

У больных внезапно высокая температура, воспаление лимфоузлов, маститы, мертворожденные, парезы, параличи.

Восприимчивы 125 видов позвоночных и 101 вид беспозвоночных, человек.

В природе возбудителя поддерживают зайцы, мыши, водяные крысы, ондатры, птицы, клещи, слепни, комары. Природные очаги в поймах рек.

Из сельскохозяйственных животных чувствительны ягнята и поросята у них септицемия, воспаление лимфоузлов, менингит.

Источник инфекции больные животные, инфицированные корма, вода, кровососущие насекомые.

Способ заражения: алиментарный, трансмиссивный, контактный, аэрогенный. Человек заражается от употребления воды, пищевых продуктов, укусов клещей, слепней, комаров.

Возбудитель *Francisella tularensis* назван в честь Э. Фрэнсиса, изучившего возбудителя и предложившего заболевание назвать туляремией. Впервые возбудителя выделили в 1911 году Г. Мак-Кой и Ш. Чепин в районе озера Туляре, в Калифорнии. Относят к отряду Gracilicutes, семейство не определено, роду Francisella. В составе рода три подвида *F.tularensis* subsp.holarctica умеренно - патогенный циркулирует в РФ.

Морфологические свойства. Грамотрицательная коккоподобная палочка, имеет капсулу, слабо воспринимает красители, размножается почкованием, может размножаться внутри фагоцитов, от чего снижается эффективность антибактериального лечения, строгий аэроб.

Культуральные свойства. Растет на элективных питательных средах с добавлением желтка, цистина. Лучшая среда – среда Мак-Коя, образует S-формы мелкие прозрачные голубоватые колонии. R- формы авирулентные.

Биохимические свойства. Каталаза – положительные, восстанавливают (обесцвечивают) красители, ферментируют глицерин, содержат цитруллинуреидазу.

Факторы вирулентности:

- *эндотоксин* вызывает гнойное воспаление, повышение температуры тела, сенсибилизацию организма, общую интоксикацию;
- капсула защищает от завершеного фагоцитоза, обеспечивает пролиферацию в фагоцитах, воспаление лимфоузлов;
- ферменты патогенности: гиалуронидаза, фибринолизин, аспарагиназа и др.

Антигенная структура. Имеет два антигенных комплекса, локализованные на поверхности клетки:

- Vi –антиген содержит липиды и белки, против него образуются Ig;
- O-антиген находится в клеточной стенке и капсуле.

Устойчивость. Длительно сохраняется в окружающей среде при низкой температуре 8-10 месяцев, под действием УФЛ погибает через 20-30 мин. В трупах грызунов жизнеспособен 3 месяца. Чувствителен к дезинфектантам: 5%-ные растворы фенола, лизола, формальдегида, хлорамин за несколько мин.

Лабораторная диагностика туляремии

Лабораторная диагностика проводится в соответствии с постановлением Главного санитарного врача от 31 мая 2010 г. №61 и основана на биологическом, бактериологическом, серологическом исследованиях материала, взятого от погибших (лимфоузлы, очаги поражения внутренних органов, головной мозг, трупы грызунов) и больных животных (сыворотка крови).

- Возбудителя можно выделить только после биопробы, которую проводят, подкожно заражая суспензией патологического материала четырех белых мышей и двух морских свинок, гибель в течение шести суток. Из крови погибших выделяют чистую культуру посевом на среду

Мак-Коя. Идентифицируют по культуральным, морфологическим свойствам и пробирочной РА с туляремийной сывороткой.

- Молекулярно-генетическое исследование (ПЦР) патологического материала с целью обнаружения ДНК возбудителя.

- Серологическое исследование больных в РА (титр 1:100 для крс, 1:25 для мрс), РНГА, ИФА.

- Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), когда мазки из патматериала, пунктата лимфоузлов обрабатывают специфической люминисцирующей сывороткой.

Иммунитет. После переболевания стойкий, пожизненный. Возбудитель элиминирует под действием Ig и клеточных факторов иммунитета. Биопрепаратов нет. Для профилактики у человека применяют живую туляремийную вакцину из штамма №15, разработанную Гайским, Эльбертом в 1946 году.

Лечение. Способность возбудителя пролифелировать внутри клеток снижает эффективность антибактериальных средств, применяют аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин.

*Лабораторная диагностика антропозоонозной чумы *Yersinia pestis**

Лабораторную диагностику антропозоонозной чумы проводят согласно Постановления №180 3.4/4.2. 19-30-2005.

Материал патологический и блохи грызунов, которых отлавливают ранней весной по всей территории РФ.

Проводят исследования без выделения возбудителя:

- бактериоскопию по Граму, обнаруживают биполярноокрашенные палочки (овоиды);
- РИФ с люминисцирующей специфической сывороткой;
- ПЦР с суспензией материала;

- РНГА для выявления антигенов возбудителя в исследуемом материале.

В НИИ особоопасных инфекций проводят:

- бактериологическое исследование с выделением чистой культуры, идентифицируют по биологическим свойствам и чувствительности к чумному диагностическому фагу;

- биопробу на морских свинках, когда чистую культуру вводят внутрибрюшинно, а патологический материал с признаками гниения втирают в кожу живота, гибель в течение 3-7 суток.

Иммунитет, биопрепараты. После переболевания стойкий пожизненный иммунитет, ведущие значение имеют клеточные факторы.

Для профилактики у человека применяют живую чумную вакцину из штамма EV. Для лечения сульфезин, сульфатон.

Для профилактики у верблюдов применяют живую чумную вакцину из штамма «Кэмэл»

*Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза
(родентиоза) Yersinia pseudotuberculosis
по МУ 3.1.1.2438-09*

Материал патологический: лимфоузлы, пораженные органы (с многочисленными очагами некроза).

В лаборатории проводят:

- биопробу, когда 10%-ной суспензией заражают внутрибрюшинно белых мышей, морских свинок, гибель в течение 2-35 суток. Из крови погибших выделяют чистую культуру, идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам и в капельной РА с диагностическими сыворотками.

Иммунитет, биопрепараты. Иммунитет не изучен, биопрепаратов для профилактики, диагностике нет. Для лечения АБП из группы аминогликозидов 1,2,3 поколения.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Контрольная работа по разделу «*Патогенные кокки, возбудители антропозоонозных инфекционных заболеваний*»

Вопросы контрольной работы №1 по частной ветеринарной микробиологии

1. Биологические свойства видов и подвидов стрептококков, циркулирующих у животных (перечислить виды и подвиды, заболевания, которые они вызывают, источника инфекции, способы заражения, морфологические, культуральные, биохимические, антигенные свойства, факторы вирулентности.

2. Устойчивость патогенных стрептококков, лабораторная диагностика стрептококковых инфекций, биопрепараты для профилактики, АБП для лечения.

3. Биологические свойства стафилококков.

4. Лабораторная диагностика стафилококковых инфекций, биопрепараты.

5. Биологические свойства *Bac.anthraxis*.

6. Лабораторная диагностика сибирской язвы, биопрепараты, АБП для лечения.

7. Биологические свойства возбудителей туберкулеза.

8. Диагностика туберкулеза, биопрепараты.

9. Возбудитель паратуберкулеза.

10. Биологические свойства бруцелл.

11. Диагностика бруцеллеза, биопрепараты.

12. Возбудитель сапа.

13. Возбудитель псевдомоноза.

14. Возбудитель антропозоонозной чумы.

15. Возбудитель псевдотуберкулеза.

16. Биологические свойства возбудителя туляремии.

17. Лабораторная диагностика туляремии.

ТЕМА 16

Возбудитель пастереллеза. Лабораторная диагностика гемофилезов

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителя пастереллеза, этапами лабораторной диагностики, биопрепаратами. Разобрать лабораторную диагностику гемофилезов.

Оборудование и материала. Таблицы, слайды, образцы биопрепаратов.

Задание для самостоятельной работы. 1. Контрольная работа по разделу: «Патогенные стафилококки, стрептококки, возбудители зооантропонозов». 2. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителя пастереллеза, гемофилезов, пользуясь слайдами, образцами биопрепаратов.

Биологические свойства возбудителя пастереллеза

Пастереллез (геморрагическая септицемия) – контактно-зoonозная, инфекционная болезнь многих видов животных, птиц с септицемией, геморрагическим воспалением серозных и слизистых оболочек, образованием отеков, пневмоний, плевритом.

Болеют: крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, кролики, птицы (куры, индейки, утки).

У кроликов, нутрий ведущее бактериальное заболевание, у птиц заболевание еще называют холерой.

У больных животных высокая температура, жажда, у млекопитающих (поросят) массовая пневмония. На вскрытии, кровоизлияния на слизистых, серозных покровах, отек легких.

Восприимчивость людей не высокая, отмечают отдельные случаи или небольшие вспышки. Протекает забо-

левание в виде кожной формы, септической – с пневмонией, энтеритом, менингитом, абсцессом мозга, или в виде стертой формы без выраженных признаков.

Источник инфекции:

- больные, переболевшие – носители;
- грызуны, дикие птицы.

Способ заражения:

- контактный;
- алиментарный;
- аэрогенный;
- у птиц трансмиссивный, после нападения инфицированных клещей.

Возбудителя холеры кур впервые выделил Л. Пастер в 1880 году и впервые разработал вакцину. В 1910 году заболевание геморрагическая септицемия, холера птиц обозначили как пастереллез. Долгое время считали, что заболевание у разных видов животных вызывают разные виды пастерелл, но в 1939 году Месробяну доказал, что возбудитель пастереллеза один вид - *Pasteurella multocida*, который относят к отделу Gracilicutes, семейству Pasteurellaceae, роду Pasteurella.

В 1953 году канадский ученый Carter установил 4 серотипа у *Pasteurella multocida*. Серотип А- циркулирует у птиц, серотип В- у крупного, мелкого скота, свиней, серотип Д – у кроликов и нутрий, серотип Е – у зебу в Африке.

По современным данным широкое распространение на территории РФ у крупного и мелкого скот, индеек имеет заболевание пастереллезом, обусловленное *Manheimia haemolytica*, представитель рода *Manheimia*.

Морфологические свойства. Грамотрицательная, мелкая, разных размеров палочка, в мазках из крови погибших окрашивается биполярно, образует капсулу, аэроб.

Культуральные свойства. Растет на основных питательных средах, но лучше на сывороточном ПА.

На МПБ – слабое помутнение, на плотных средах образует мелкие и средние S, R, M – формы колоний. S- формы вирулентные, это прозрачные, флуоресцирующие, выпуклые колонии.

Биохимические свойства. Медленно сбраживают глюкозу, сахарозу, манит, сорбит, образуют каталазу, индол, не плавят желатин, не пептонируют молоко, не образуют сероводород.

Факторы вирулентности:

- капсула;
- эндотоксин;
- ферменты патогенности, у возбудителя много гиалуронидазы, лецитиназы, уреазы от чего геморрагическое воспаление, сильная интоксикация организма больных животных.

Антигенные свойства. Возбудитель имеет K-, и O-антигены. По специфичности K-антигенов возбудитель подразделяют на 4 серотипа: А, В, Д, Е, серотипы определяют в РНГА, пользуясь специфическими сыворотками. Серотипы А и Д можно определить в трепановой пробе (тест на гиалуроновую кислоту): к 0,5 мл бульонной культуры добавляют 0,5 мл трипофлавина 1:1000, серотипы А и Д образуют осадок. По специфичности O-антигена возбудитель подразделяют на 20 серогрупп.

Устойчивость невысокая: в почве - 7 дней, в навозе - в течение 2-3 недель, трупах - 4 месяца, в замороженном мясе – 12 месяцев. При 50⁰ С погибает за 30 мин, при кипячении – мгновенно. Растворы 2%-ные гидроксида натрия, формальдегида обезвреживают возбудителя за 10 мин.

Лабораторную диагностику проводят согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллеза животных и птиц от 20.08.1992 года.

Материал патологический: внутренние органы погибших, трупы птиц, кроликов.

В лаборатории проводят:

- *бактериоскопию мазков-отпечатков* крови внутренних органов, суспензии паренхиматозных органов по Романовскому-Гимза, Гинсу, обнаруживают овоиды (биполярно окрашенные) палочки, капсульные палочки;

- бактериологическое исследование, которое включает посев из внутренних органов на МПБ, МПА или сывороточный МПА, выделенные культуры идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам и результатам биопробы, когда чистой выделенной культурой заражают белых мышей 0,2 мл подкожно, культурами, выделенными от птиц заражают 90-120-дневных цыплят по 0,5 мл внутримышечно, гибель в течение 18-72 часов. Для определения вирулентности ослабленных культур, выделенных на фоне антибиотикотерапии у птиц, заражают 1-2-суточных цыплят в дозе 0,1 мл интраорбитально, гибель в течение 18-48 часов. У погибших отмечают типичные патологоанатомические изменения, обнаруживают биполяры в крови.

- ИФА с сывороткой кровидля выявления Ig протииманхеймий

Иммунитет, биопрепараты. Иммунитет нестерильный, даже вакцинированные животные могут быть носителями пастерелл. Для профилактики заболевания применяют 15 вакцин:

- эмульгированная против пастереллеза кроликов и нутрий;

- эмульгированная против пастереллеза крс, буйволов, овец;

- эмульгированная против пастереллеза свиней;

- преципитированная формолвакцина для овец и свиней;

- ассоциированная формолгидроокисьалюминиевая вакцина против пастереллеза, сальмонеллеза, стрептококкоза свиней.

Для профилактики пастереллеза птиц выпускают:

- жидкую инактивированную вакцину для аэрозольного применения (сплит вакцина – экстракт капсул пастерелл);
- живую вакцину из штамма К для водоплавающих, закапывают в синус.

Для лечения и профилактики выпускают гиперимунную сыворотку против пастереллеза крс, буйволов, овец, свиней.

Для лечения применяют сыворотку и АБП: окситетрацилин, драксин, скипидар внутривенно 1,5 – 2 мл.

Лабораторная диагностика гемофильного полисерозита по Временному МУ №116-18 от 01.10.1988 г.

Инфекционное септическое заболевание поросят (35 - 75-дневного возраста) с воспалением серозных оболочек (перикарда, плевры, брюшины), менингитом и артритом.

Источники: взрослые – носители и переболевшие поросята.

Способ заражения через слизистые, а способ распространения аэрогенный.

Заболевание впервые описал Глессер в Германии в 1910 году, возбудителя выделили Шермер, Эрлих в 1922 году. Заболевание в СССР установлено в 1975 году.

Возбудитель гемофильная палочка *Haemophilus parasuis*, относят к отряду Geacilicutes, семейству Pasteurellaceae, роду Haemophilus.

Лабораторное исследование по Временному МУ от 1988 года, №116-18.

Материал – свежий экссудат. В лаборатории проводят:

- бактериоскопию по Граму;
- бактериологическое исследование с выделением чистой культуры и идентификацией по морфологическим, культуральным свойствам;

- биопроба на морских свинках, после внутрибрюшинного заражения гибель в течение 5 суток.

Иммунитет, биопрепараты. Иммунитет нестерильный, вакцинированные свиноматки передают антитела с молоком поросётам, колостральный иммунитет сохраняется 30-45 дней. Для плановой профилактики применяют инактивированные вакцины. Широко применяют вакцину Донобан-1.0 Для лечения –АБП: аминогликозиды разных поколений, окситетрациклин, энрофлоксацин.

Лабораторная диагностика актинобациллезной плевропневмонии свиней

Актонобациллезная плевропневмония – контагиозная болезнь молодняка и взрослых свиней с геморрагической пневмонией и плевритом при остром течении, а при затяжном – некротической пневмонией и плевритом.

Болеют свиньи всех возрастов, но особенно 2-6- месячного возраста.

Источник: больные, носители.

Способ заражения: аэрогенный.

Первые заболевание описал и выделил возбудителя Оландер в 1963 году, в Калифорнии. В СССР зарегистрировано в 1979 году.

Первоначально возбудитель болезни был отнесен к роду *Haemophilus*, но затем по гомологии ДНК включен в род *Actinobacillus*, семейства *Pasteurellaceae*, виду ***Actinobacillus pleuropneumonia***.

Лабораторную диагностику проводят по Временному МУ по лабдиагностике гемофилезной плевропневмонии свиней от 16.04.1981г. №115-6

Материал патологический: кусочки легких, лимфоузлы, доставленный со льдом. В лаборатории проводят:

- бактериоскопию мазков-отпечатков;
- бактериологическое исследование с посевом иссле-

дуемого материала и идентификацией по морфологическим, культуральным свойствам и вирулентности для белых мышей при внутрибрюшинном заражении.

Иммунитет, биопрепараты. У переболевших формируется антитоксический, антибактериальный иммунитет. Плановая вакцинация свиноматок инактивированной, сорбированной вакциной, для лечения АБП.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства возбудителя пастереллеза.
2. Лабораторная диагностика, профилактика пастереллеза, биопрепараты.
3. Возбудитель гемофильного полисерозита.
4. Возбудитель актинобациллезной плевропневмонии.

ТЕМА 17

Возбудитель рожи свиней, листериоза

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителя рожи свиней, лабораторной диагностикой заболевания, биопрепаратами для профилактики и лечения заболевания. Разобрать лабораторную диагностику листериоза, биопрепараты для профилактики, АБП для лечения.

Оборудование и материалы. Посевы возбудителей рожи свиней и листериоза (штамм VR-2, биопрепараты, АБП для лечения).

Задание для самостоятельной работы. 1. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителей, лабораторной диагностикой. 2. Провести бактериоскопию взвесей вакцинных штаммов возбудителей, результат за-

рисовать. 3. Познакомиться с биопрепаратами для профилактики, АБП для лечения изучаемых заболеваний.

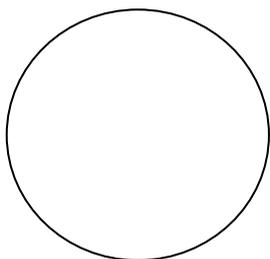


Рис. 20. Возбудитель рожи

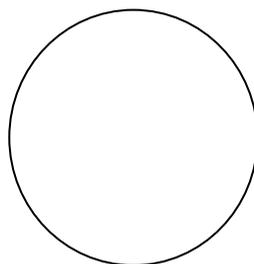


Рис. 21. Возбудитель листериоза

Биологические свойства возбудителя рожи свиней

Инфекционное заболевание свиней старше 3 месяцев с септициемией и крапивницей (аллергический дерматит).

Болеют свиньи, спорадически – лошади, крупный рогатый скот, овцы, куры, голуби, человек. У других животных заболевание называют эризипеллоид.

У больных септициемия с высокой температурой, ознобом, интоксикацией от чего понижается артериальное давление, позже крапивница на ушах, холке (выражена слабо). Длительная септициемия может дать осложнения: эндокардит, артриты. Неэффективное лечение – рецидив.

Источник инфекции: переболевшие, больные, инфицированные кровососущие, механические переносчики и носители (крысы, мыши).

Способ заражения: алиментарный, контактный, трансмиссивный.

Возбудитель *Erysipelothrix rhusiopathia*, *E. insidiosa* впервые выделен Пастером, Тюлье 1882 году. Отдел Firmicutes, семейство Corynebacteriaceae, род *Erysipelothrix*.

Морфологические свойства. Грамположительная тонкая длинная, слегка волнистая палочка, микроаэрофил.

Культуральные свойства. Растет на элективных питательных средах, содержащих пептоны, сыворотку крови, глюкозу в микроаэрофильных условиях. Образует мелкие, выпуклые, прозрачные колонии. На жидких средах – слабое помутнение. Продолжительность культивирования 24-48 часов.

Биохимические свойства. Расщепляет глюкозу, лактозу, образует сероводород, не образует каталазу, не разлагает маннит.

Факторы вирулентности. Имеет эндотоксин, он же сенсibiliзирует организм, клинически – крапивница.

Антигенные свойства. Имеет видовой N антиген, известно 22 сероварианта, в РФ циркулирует два А и В. Серовариант В содержит протективный антиген.

Устойчивость. В трупах 10-12 месяцев, в почве 7-8 месяцев, в навозной жиже 290 дней, в воде 108 дней. В копченостях – 3 месяца, в сале до 6 месяцев. Возбудитель чувствителен к дезинфектантам: 2%-ным раствором гидроксида натрия, формальдегида, хлорной извести, 1%-ном раствором йодеза, виркона С погибает за несколько минут.

Лабораторная диагностика рожи свиней

Проводят в соответствии с Методическими указаниями по лабораторной диагностике рожи (эризипелоида) свиней от 26.01.2001 №13-5-02/0050.

Материал только патологический: сердце с кровью, доля печени, селезенка, почка, трубчатая кость. Материал берут от погибших свиней без признаков крапивницы.

В лаборатории проводят:

- *бактериоскопию мазков* отпечатков патологического материала по Граму и люминесцентную, когда мазки обрабатывают противорожистой сывороткой, возбудитель ярко блесит;

- *бактериологическое исследование:* выделяют чи-

стую культуру, идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам и в капельной РА с гипериммунной противорожистой сывороткой, разведенной 1:50. Обязательно определяют вирулентность выделенных культур, заражая белых мышей 0,2 мл подкожно, гибель в течение 2-4 суток;

- *биопробу* проводят, если материал с признаками порчи, заражая 10%-ной суспензией патматериала подкожно по 0,2 мл белых мышей. Гибель в течение 2-4 суток, от погибших выделяют чистую культуру.

Иммунитет. Биопрепараты. У переболевших напряженный, длительный иммунитет и носительство. Плановая профилактика, используют вакцины:

- концентрированная гидроокисьалюминиевая формолвакцина с 2 месячного возраста;

- живая вакцина из штамма VR-2, выпускают сухую вакцину, применяют с 3 месячного возраста;

- гипериммунная сыворотка против рожи свиней.

Стартовый антибиотик пенициллин, но лучше ЦС-антибиотики любого поколения, в конце лечения бициллин. Применяют симптоматические средства: кордиамин, кофеин, седуксен.

Биологические свойства возбудителя листериоза

Листериоз – природноочаговое инфекционное заболевание многих видов животных, человека с септицемией, поражением нервной системы, половых органов.

Болеют овцы, свиньи, крупный рогатый скот, пушные звери, кролики, домашние и дикие птицы, грызуны, человек.

У больных высокая температура, мертворожденные, менингит, отек мозга.

Природные очаги заболевания поддерживают грызуны, дикие животные, клещи, дикие птицы.

Источник инфекции больные и переболевшие, клещи.
Способы заражения животных:

- контактный;
- трансмиссивный;
- алиментарный.

У человека: алиментарный, аэрогенный.

Возбудитель относят к отделу *Firmicutes*, семейству *Corynebacteriaceae*, роду *Listeria*, виду *Listeria monocytogenes*.

Впервые возбудителя от больных кроликов выделил Гюльферс в Швеции в 1911 году, в 1927 году Пири выделил возбудителя от грызунов и предложил назвать в честь английского хирурга Листера – основоположника антисептики, листериями. Название утвердили в 1940 году.

Морфологические свойства. Грамположительные крупные палочки, края округлены, располагаются по одиночке, парами и в виде римской цифры Y, подвижные, образуют капсулу, имеют факультативное дыхание.

Культуральные свойства. Растут на элективных питательных средах:

- на МПБ слабое помутнение, затем слизистый осадок;
- на сывороточно-глюкозном агаре мелкие, выпуклые, прозрачные колонии с голубоватым оттенком;
- на сывороточно-теллуритовом агаре черные, блестящие колонии;
- на кровяном агаре мелкие, выпуклые колонии с зоной β –гемолиза.

R –формы образуют налет. Культивирование проводят в течение 48 часов.

Биохимические свойства. Расщепляют с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, трегалозу, салицин, образуют каталазу.

Факторы вирулентности:

- эндотоксин, вызывает воспаление, обладает пиро-

генным действием, формирует общую интоксикацию организма, поражение ЦНС;

- гемолизин повреждает эритроциты;
- фосфолипазы способствуют проникновению возбудителя в клетки в том числе в моноциты, от чего их бурная пролиферация и моноцитоз.

Антигенная структура. Имеет О- соматический и Н-жгутиковый антигены. По специфичности Н-антигенов выделено 16 серотипов. В РФ у животных циркулирует 2, 5, 6, 7, 9 серотипы.

Устойчивость. В почве - 6-11 месяцев, в воде - 12 месяцев, в навозе – 7 месяцев, силосе – 12 месяцев, мясе – 12 месяцев. Растворы 2,5%-ные формалина, гидроксида натрия уничтожают за 20 мин. Хлорная известь (1%-ный раствор) - за 1 час. Выдерживает 10 минутное кипячение. Образует L-формы.

Лабораторная диагностика листериоза

Лабораторную диагностику листериоза животных и людей проводят в соответствии с Методическими рекомендациями от 19.02.1987 г.

Материал:

- патологический: внутренние органы, головной мозг;
- клинический: сыворотка крови больных.

В лаборатории проводят:

- *бактериоскопическое исследование* по Граму;
- *бактериологическое исследование*, когда делают посеvy суспензии патологического материала 1:5 на элективные среды, идентифицируют по морфологическим, культуральным свойствам, подвижности, биохимическим свойствам, чувствительности к диагностическим фагам L2A и L4A. Определяют серотип в капельной РА, определяют вирулентность выделенных культур внутрибрюшинным заражением белых мышей в дозе 0,3-0,5мл, гибель через 2-6 суток;

▪ *биопроба* на морских свинках (конъюнктевальная проба, развивается кератоконъюнктивит) или дермонекротическая проба на кролике, после внутрикожного заражения образуется абсцесс, который затем изъязвляется;

▪ серологическое исследование, ставят РА: у крс титр 1:320, у мрс, свиней титр 1:160, у кроликов 1:40; ставят РСК у всех видов животных, титр 1:5.

Если материлом служит силос, проводят бактериологическое исследование и биопробу.

Иммунитет, биопрепараты. У переболевших напряженный иммунитет и длительное носительство от 30 до 500 дней. Для профилактики заболевания в очагах применяют живую вакцину из штамма АУФ, напряженность 1 год. Основу лечения составляет антибиотикотерапия, используют цефалоспорины и аминогликозиды разных поколений.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Возбудитель рожи свиней.
2. Возбудитель листериоза.
3. Клинические формы эшерихиоза, источники инфекции, способы заражения.
4. Биологические свойства *E.coli*.
5. Антигенные свойства и устойчивость возбудителя эшерихиоза.
6. Лабораторная диагностика эшерихиоза, биопрепараты.

ТЕМА 18

Лабораторная диагностика эшерихиоза, биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами возбудите-

ля, антигенной идентификацией, лабораторной диагностикой, биопрепаратами для профилактики и лечения.

Оборудование и материалы. Посевы возбудителя эшерихиоза, биопрепараты для диагностики заболевания, профилактики, АБП для лечения

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести бактериоскопию колоний *E.coli*, посева фекалия больного теленка. 2. Поставить капельную РА с антиадгезивной сывороткой и колонией *E.coli*. Познакомиться с биопрепаратами для профилактики, АБП для лечения.

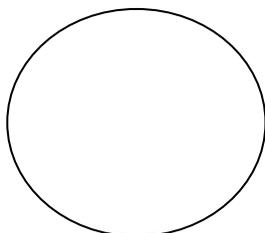


Рис. 22. Возбудитель эшерихиоза

Возбудитель *Escherichia coli*, впервые выделил Эшерих в 1885 году из фекалий больного ребенка.

Относят к отделу Gracilicutes, семейству Enterobacteriaceae, роду *Escherichia*, в составе рода два вида *E.coli* и *E.blatta*, последний вид заболевания у теплокровных не вызывает.

Лабораторная диагностика эшерихиоза (колибактериоза)

Проводят в соответствии с МУ по диагностике колибактериоза от 27.07.2000г

Материал для исследований:

▪ патологический (доля печени с желчным пузырем, сердце с кровью, содержимое 12-перстной кишки с брыжечным лимфоузлом, трубчатая кость, трупы цыплят);

- клинический (фекалий больных, который берут в стерильную посуду).

В лаборатории проводят бактериологическое исследование, чистую культуру идентифицируют до вида по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, вирулентность выделенной культуры устанавливают, испытывая:

- в капельной РА с антиадгезивными сыворотками, если результат отрицательный, определяют серовариант;

- в капельной и пробирочной РА с О-коли агглютинирующими сыворотками, если не удастся определить серовариант выделенной культуры, то проводят:

- биопробу, заражая внутрибрюшинно по 0,5 мл 1-миллиардной культурой белых мышей, гибель в течение 2 суток. Если культура выделена от цыплят, то биопробу проводят на цыплятах 4-5-недельного возраста, внутрибрюшинным заражением 1-миллиардной суспензией, гибель в течение 4 суток.

Культуру, выделенную от поросят сеют на кровяной агар (кровь кролика или барана). Если вырастают колонии с гемолизом, дают заключение о выделении возбудителя.

Определяют чувствительность выделенных культур к АБП.

Иммунитет, биопрепараты. У переболевших иммунитет нестерильный. Формируется колостральный у молодняка от вакцинированных матерей. *Плановая вакцинация у телят с использованием вакцин:*

- Вероколивак содержит сорбированные на гидроксале алюминия протективные антигены: соматические К-88, К-99, Р-987, F-41, анатоксины: ТЛ, ТС, VT1, VT2;.

- вакцина Коли-Вак представляет сорбированные на гидроксале алюминия протективные антигены: соматические (O₉, O₇₈, O₁₄₁), адгезивные (К-88, К-99, Р-987, F-41), капсульные (К-80, К-90, К87), термолабильный и термо-

стабильный анатоксины. Предложена вакцина в 1997 году. Применяют самкам за 1,5-2 месяца до отела, опороса, лисам песцам за 2-3 недели до гона, двукратно для создания колострального иммунитета молодняка. Поросятам, ягнятам перед отъемом, щенкам песцов, лис в 30-40-дневном возрасте.

- Колипротектан–взвесь инактивированных нагреванием распространенных серовариантов *E.coli*, применяют внутрь 5 раз в день в дозе 10-15 мл с теплой кипяченой водой.

- Формолвакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая против колибактериоза (эшерихиоза) телят, ягнят, применяют внутримышечно, двукратно самкам за 2 месяца до родов.

Для профилактики эшерихиоза поросят выпускают:

- вакцина против эшерихиоза, псевдомоноза и энтерококковой инфекции поросят

Для профилактики колибактериоза у птиц применяют:

- вакцина инактивированная против колибактериоза птиц нативная.

Для профилактики и лечения заболевания у сельскохозяйственных животных применяют:

- сыворотку поливалентную против колибактериоза с/х животных;

- сыворотку антиадгезивную, антитоксическую против эшерихиоза с/х животных.

Для лечения применяют АБП, к которым чувствителен возбудитель, при септической форме внутримышечно, при других внутрь:

- антибиотики (левомецетин, гентамицин, тетрациклины, тилозин);

- сульфаниламидные препараты (сульфадимезин, фталазол, этазол, сульфален);

- нитрофурановые (фуразолидон, фурагин, фурадонин);

▪ фторхинолоновые (энрофлоксацин, офлоксацин), другие (диоксинорм, фармоксидин). Применяют симптоматические средства против обезвоживания.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Характеристика сальмонеллезов.
2. Биологические свойства сальмонелл.
3. Лабораторная диагностика сальмонеллезов.
4. Биопрепараты для профилактики, АБП для лечения.

ТЕМА 19

Лабораторная диагностика сальмонеллезов, биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами сальмонелл, антигенной идентификацией, лабораторной диагностикой, биопрепаратами для профилактики и лечения.

Оборудование и материалы. Посевы вакцинного штамма *Salmonella typhisuis* TC-177, биопрепараты для диагностики сальмонеллезов, профилактики, АБП для лечения.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести бактериоскопию колоний сальмонелл, результат зарисовать 2. Поставить капельную РА с комплексными сальмонеллезными сыворотками и колонией *Salmonella typhisuis*. 3. Познакомиться с биопрепаратами для профилактики, АБП для лечения.

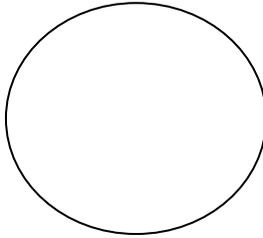


Рис. 23. Сальмонеллы

Сальмонеллезы – инфекционные заболевания человека, животных, птиц, вызываемые разными серовариантами сальмонелл – микроорганизмами рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae*, 1 и 2 подвида.

У человека заболевание может протекать в виде брюшного тифа, возбудитель которого *S.typhi*. Заболевание с симптомами брюшного тифа может возникнуть от внедрения *S.paratyphi A* и *S.paratyphi C*. Перечисленные сероварианты сальмонелл для животных не опасны и не циркулируют у них.

Сальмонеллез человека распространенное заболевание от проникновения сальмонелл разных серовариантов. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют *S.typhimurium*, *S.enteritidis*. Сальмонеллез человека может протекать в гастроэнтеритной и генерализованной формах, последняя имеет два варианта:

- тифоподобная,
- септикопиемическая.

Источником сальмонеллеза человека могут быть больные животные, носители, продукты, полученные от больных, носителей, а также больной человек, переболевший.

Сальмонеллезу, обусловленному *S.enteritidis*, свойственно преобладание в качестве источника инфекции птицепродуктов, инфицированных этим серовариантом сальмонелл.

Сальмонеллезом (паратифом) болеют *телята* от 10 дней до 2 месяцев. Возбудитель *Salmonella dublin*, реже *Salmonella typhimurium*. Заболевание протекает тяжело с септицемией, интоксикацией, сердечной недостаточностью, пневмонией, пиелонефритом, энтеритом. На определенной стадии болезни преобладают те или иные признаки, которые приводят к гибели больных. Заболевание может принимать хроническое течение, больные телята имеют признаки хронической пневмонии, артрита, энтерита.

Паратифом (сальмонеллезом) болеют *овцематки и ягнята*. Возбудитель *Salmonella abortusovis*. У овцематок мертворожденные или больные ягнята, которые умирают в первые сутки жизни, задержание последа, эндометрит, бесплодие. Здоровые ягнята заражаются от больных и овцематок-носителей. Заболевание протекает тяжело, по механизму развития подобно паратифу телят.

Паратифом болеют *поросята* с первых дней жизни и до 4 –месячного возраста. Возбудитель *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhisuis*. Заболевание протекает с септицемией, энтеритом, пневмонией, поражением суставов.

Сальмонеллезом (паратифом) болеют *конематки и жеребята*. Возбудитель *Salmonella abortusequi*. У конематок мертворожденные или больные жеребята, задержание последа, бесплодие. Новорожденные больные не встанут на ноги, у них диарея, септицемия, гибель на 2-3 день. Если жеребята заразились, то заболевание протекает 7-10 дней с такими же признаками.

У млекопитающих *источник инфекции* больные и переболевшие – носители.

Способ заражения контактный, алиментарный.

Сальмонеллезом болеют *цыплята до 50-дневного возраста*, заболевание называют *пуллороз*, возбудитель *Salmonella pullorum*. Заболевания протекает в виде септицемии или септикопиемии, а также с энтероколитом, пери-

тонитом, интоксикацией. Если гибель цыплят от септицемии или септикопиемии, то на вскрытии обнаруживают абсцессы на сердце, легких, печени. Таковую форму заболевания наблюдают в первые 10 дней жизни, если заражение произошло трансвариально, или аэрогенно в период инкубации. Энтероколитную форму заболевания с интоксикацией выявляют у цыплят, погибших в период оперения и заразившихся алиментарно на объекте.

Цыплята старше 50 дней и взрослые куры болеют сальмонеллезом, заболевание называют тиф. Возбудитель ***Salmonella gallinarum***. Заболевание протекает с септицемией, энтероколитом, интоксикацией.

Куры могут быть носителями многих видов сальмонелл, которые не вызывают у них заболевания, но инфицируют птицепродукцию. К представителям транзиторной микрофлоры кишечника кур относят ***Salmonella enteritidis***, ***Salmonella typhimurium***, ***Salmonella anatum***.

Паратифом (сальмонеллезом) болеют водоплавающие. Возбудитель ***Salmonella typhimurium***, ***Salmonella enteritidis***, ***Salmonella anatum***. Заболевание протекает в септической и энтероколитной форме.

Лабораторная диагностика сальмонеллезом

В соответствии с МУ от 1990 года и дополнениями в МУ от 1994г., МУ 4.2.2723-10 и МУ по обнаружению сальмонелл в пищевых продуктах, объектах окружающей среды Федерального центра Роспотребнадзора от 2011г.

Материал для исследований:

- патологический (внутренние органы, трупы птиц);
- клинический (фекалий больных, сыворотка крови);
- яйцо, тушки птиц.

В лаборатории проводят:

- бактериологическое исследование с выделением чистой культуры и идентификацией по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, определяют

серовариант в капельной РА с О-комплексными сыворотками, О-,Н- монорецепторными сыворотками, определяют чувствительность сальмонелл к АБП;

- серологическое исследование с целью выявления носительства сальмонелл у кур родительского стада, ремонтного молодняка в возрасте 50-55 дней в кровяно-капельной РНГА, используя пуллорный эритроцитарный антиген. Положительно реагирующих выбраковывают, в помещении дезинфекция;

- серологическое исследование сыворотки крови хронически больных телят в РА с сальмонеллезным антигеном серогруппы Д₁;

- серологическое исследование сыворотки крови овцематок в РА с сальмонеллезным антигеном серогруппы В или в РНГА с эритроцитарным антигеном серогруппы В;

- бактериологическое исследование яиц, мяса птицы.

Биопрепараты, средства лечения

У *телят* плановая профилактика, применяют вакцины:

- концентрированную формолквасцовую против паратифа телят;

- живая вакцина из аттенуированного штамма Дублин-6.

Поросятам применяют вакцины:

- живая, сухая из штамма ТС-177;

- живая, сухая из супрессорного ревертанта *S.choleraesuis* №9;

- живая сухая из штаммов №9 и *S.typhisuis* №3;

- инактивированная вакцина против паратифа свиней;

- формолквасцовая вакцина против паратифа овец применяют овцематкам перед осеменением и окотом двукратно для создания колострального иммунитета у ягнят;

- живая вакцина против паратифа овец, вакцинируют овцематок перед окотом для создания колострального иммунитета у ягнят;

- ассоциированная вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза поросят;
- вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза, энтерококковой инфекции поросят нативная.

Для водоплавающих применяют живую, сухую вакцину из аттенуированного штамма *S.typhimurium*.

Выпускают для лечения и профилактики поливалентную, антитоксическую сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц.

Для профилактики и лечения паратифа водоплавающих применяют сальмофаг против *S.enteritidis*.

Больных лечат с использованием АБП (антибиотиков, сульфаниламидных препаратов, фторхинолоновых, нитрофурановых), к которым чувствителен возбудитель. Обязательно применяют симптоматические средства

- солевые растворы;
- дезинтоксицирующие;
- диуретики.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Возбудитель эмкара.
2. Возбудитель столбняка.
3. Возбудитель некробактериоза.
4. Возбудитель копытной гнили.

ТЕМА 20

Лабораторная диагностика анаэробных инфекций (эмкара, столбняка, некробактериоза, ботулизма, копытной гнили), биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами возбудителей. Разобрать лабораторную диагности-

ку. Познакомиться с биопрепаратами для профилактики эмкара, столбняка, некробактериоза, АБП для лечения.

Оборудование и материалы. Таблицы, электронный ресурс «Анаэробные инфекции», образцы биопрепараты для профилактики, АБП для лечения, образцы силоса, лабораторные животные.

Задание для самостоятельной работы. 1. Познакомиться с биологическими свойствами возбудителя ботулизма, лабораторной диагностикой. 2. Освоить методику биопробы для выявления токсинов ботулизма в силосе. 2. Познакомиться с биопрепаратами для профилактики эмкара, столбняка, некробактериоза, АБП для лечения.

Биологические свойства возбудителя ботулизма

Инфекционная болезнь с тяжелой интоксикацией и поражением цнс, возникающее от употребления кормов, содержащих токсины возбудителя.

Болеют лошади крупный и мелкий рогатый скот от поедания пораженного возбудителем силоса. Норки от поедания рыбы, боенских отходов, птица, а болеют водоплавающие, поедая мертвых лягушек. Человек болеет, употребляя мясные, рыбные, овощные консервы, содержащие токсин или возбудителя.

Токсины, всасывается в кровь, поражают синапсы, моторные нейроны спинного, продолговатого мозга. Клинически паралич глотки, языка, парез конечностей, кома, смерть от паралича дыхательного центра. Токсины поражают сосуды сосудистой оболочки глаза.

Источник возбудителя почва, где споры хранятся годами, много в придонном иле, инфицирует рыб.

Способ заражения алиментарный, редко раневой.

Возбудитель ***Clostridium botulinum*** относят к отделу **Firmicutes**, роду ***Clostridium***. Обнаружен в 1869 году ван Эрменгемом.

Морфологические свойства. Грамположительная крупная палочка, образует овальную спору, со спорой возбудитель имеет вид теннисной ракетки. Подвижный, строгий анаэроб.

Культуральные свойства. На кловстридиальном бульоне помутнение и запах масляной кислоты. На кровяном глюкозном агаре колонии «паучки» с зоной гемолиза. В столбиках сахарного агара колонии «комочки ваты». Оптимальная температура для образования токсина +35⁰ С.

Биохимические свойства. Расщепляют многие углеводные субстраты, но эти свойства непостоянные, некоторые штаммы плавят мышцы и печень.

Факторы вирулентности:

- экзотоксины нейротоксического действия, известно 7 типов токсинов (А,В,С,Д,Е,Ф,Г), которые отличаются антигенными свойствами и ядовитостью. Самый ядовитый – А, превосходит все известные яды. Лошади болеют от токсина В, скот – С,Д, норки –С, человек – А,В,Е, реже С,Д. В составе экзотоксина не менее 5 факторов, в том числе гемолизин, протеаза, липаза;

- ферменты проникновения: лецитиназа, декарбоксиллазы.

Антигенные свойства. Возбудитель имеет Н- и О-антигены, но для лечения и профилактики имеет значение тип токсина, который устанавливают в реакции нейтрализации (РН).

Устойчивость. Вегетативные форма мало устойчивы: 80⁰ С – 30 мин, кипячение выдерживают в течение 2-5 мин. Споры устойчивы, штаммы, продуцирующие токсины А,В,Ф выдерживают 6-часовое кипячение, уничтожить можно только автоклавированием 1,2 атм – 30 мин, или 2атм -20 мин. Споры устойчивы к дезинфицирующим средствам. Ботулинические токсины разрушаются при кипячении через 15-20 мин, если в зерне – через 2 часа.

*Лабораторная диагностика согласно
ГОСТ 10444 от 1986 г.*

Материал:

- корм, вызвавший отравление;
- кусочки печени погибших.

Исследуемый материал растирают в ступке, заливают стерильным физраствором, настаивают 1-2 часа, фильтруют. Проводят:

- биопробу на белых мышах 2 мышам в/б 0,5 -0,3 мл сырого экстракта, 2 другим 0,5 -0,3мл кипяченого в течение 30 мин экстракта, если есть токсины, мыши, зараженные сырым экстрактом, погибают. Можно провести биопробу на морских свинках, тогда доза для заражения 1 мл подкожно.

- реакция нейтрализации на белых мышах с использованием смеси антитоксических ботулинических сывороток;

- биопроба с антитоксическими сыворотками разных типов, которые вводят подкожно по 2 мл и заражают мышей исследуемым материалом. В живых остаются мыши при соотвествии токсина типу антитоксической сыворотки;

- бактериологическое исследование включает посеvy исследуемого материала на кластридиальный бульон, кровяной, глюкозный агар, выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным свойствам.

Иммунитет. Биопрепараты. После переболевания иммунитет не образуется. Создать иммунитет можно с помощью анатоксина. Для профилактики заболевания у норок выпускают формолквасцовую вакцину – анатоксин С, применяют внутримышечно 1 мл, через 2-3 недели иммунитет, напряженность 1 год.

В медицине выпускают антитоксические противоботулинические сыворотки против типов А,В,С,Е, применяют внутривенно ежедневно до достижения клинического эффекта.

Все заболевшие животные погибают, не допускать применение кормов, содержащих токсины и возбудителя.

Лабораторная диагностика эмкара

Возбудитель *Cl.chauvoei*. Проводят по МУ от 10.10.1982г. Материал патологический: кусочки тканей в местах отеков.

В лаборатории проводят:

- бактериоскопическое исследование, обнаруживают крупные палочки веретенообразной формы;
- бактериологическое исследование, делают посев на клостридиальный бульон, затем на глюкозно-красный агар, идентифицируют по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, выделенные культуры вызывают отеки и гибель морских свинок в течение 24-46 часов;
- биопробу, когда суспензией патматериала заражают морских свинок подкожно в области живота, гибель с сильными отеками в течение 24-46 часов, от погибших выделяют чистую культуру, идентифицируют.

Иммунитет, биопрепараты. В неблагополучных местах плановая вакцинация, применяют:

- концентрированную гидроокисьалюминиевую формулвакцину (анатоксин), напряженность иммунитета 6 месяцев;
- живую вакцину из штамма 1/14, напряженность 12 месяцев;
- ассоциированную живую вакцину против сибирской язвы и эмкара.

Для *лечения* при первых признаках заболевания применяют пенициллин, антибиотики ЦС-группы разных поколений.

Лабораторная диагностика столбняка

по МУ от 02.02 1983 г.

Диагноз ставят по клиническим признакам, если не

видели клинику заболевания, проводят лабораторное исследование в двух направлениях:

- обнаружения токсина;
- выделение чистой культуры возбудителя **Cl.tetani**.

Материал патологический: содержимое раны, селезенка, печень погибших.

Для выделения токсина проводят:

- биопробу на белых мышах или морских свинках, заражая экстрактом патологического материала подкожно или внутримышечно белых мышей в дозе 0,5-1,0, морских свинок 3,0-5,0, гибель с клиникой заболевания.

Для выделения возбудителя применяют методы:

- бактериологическое исследование, делают посевы на клостридиальный бульон, пересевают на кровяной, глюкозный агар, выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным свойствам, вирулентность подтверждают биопробой;
- РИФ с мазками-отпечатками патматериала, почвы, возбудитель ярко блесит.

Иммунитет, биопрепараты. В неблагополучных местах плановая вакцинация у лошадей, овец, применяют:

- концентрированный столбнячный анатоксин.

Лечение бесперспективно, все заболевшие погибают.

Лабораторная диагностика некробактериоза по МУ ГУВ МСХ СССР02.10 1983г

Возбудитель **Fusobacterium necrophorum**. Исследования проводят в соответствии с МУ от 01.06. 1987 г.

Материал клинический – некротические поражения, в лаборатории проводят:

- бактериоскопию по Граму, Романовскому – Гимза, ориентировочно, окрашивая мазки метиленовой синькой, обнаруживают зернисто окрашенные нити или длинные, тонкие, грамотрицательные палочки;

- бактериологическое исследование, когда материал сеют в клостридиальный бульон, потом на глюкозо-красный агар, инкубируют трое суток, идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам;

- биопроба на кролике, заражая подкожно с латеральной поверхности уха, через 2-4 дня развивается некроз, на 6-10 день гибель кролика, можно заразить белых мышей подкожно, на 8 день некроз, на 10-14 день гибель.

Иммунитет, биопрепараты. Для профилактики применяют вакцины:

- инактивированную, эмульгированную ВИЭВ;
- Нековак, инактивированная, нативная.

Для *лечения* применяют нитокс, гентамицин, тилозин внутримышечно, местно растворы: 1%-ного азотнокислого серебра, 2,5%-ного креолина, 5%-ного лизола, 10%-ного цинкосола, 10%-ного медного купороса, 10%-ного формалина.

Лабораторная диагностика копытной гнили по МУ от 25.12.1985 г.

Возбудитель **Dichelobacter nodosus (Bacteroides nodosus)**. Материал для исследований:

- слизь, некротические ткани в месте поражения;
- сыворотка крови. В лаборатории проводят:
 - микроскопию мазков-отпечатков слизи, некротической массы по Граму, обнаруживают прямые или изогнутые палочки с закругленными концами с утолщениями на концах;
 - РИФ с некротической массой, возбудитель ярко блестит;
 - РСК с сывороткой крови, у больных положительная.

Биопрепаратов нет. *Лечение* местное с использованием растворов сульфата цинка, меди, формалина, внутримышечно назначают бициллин, дибиомицин, дитетрацилин.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Возбудитель ботулизма.

ТЕМА 21

**Возбудители злокачественного отека, бродзота.
Заболевания, вызываемые *Cl.perfringens***

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителей, лабораторной диагностикой, биопрепаратами, АБП для профилактики и лечения.

Оборудование и материалы. Таблицы, мазки возбудителей, питательные среды для культивирования, образцы биопрепаратов для профилактики, АБП.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести бактериоскопию и зарисовать морфологические свойства возбудителей. 2. Познакомиться с образцами биопрепаратов, АБП.

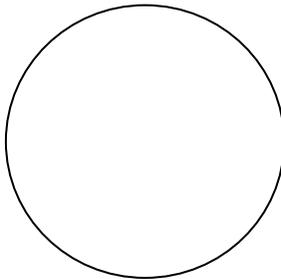


Рис. 24. *Cl perfringens*

Возбудители злокачественного отека

Острая неконтагиозная болезнь всех видов животных, возникающая после ранений, родов, кастраций и ха-

рактеризующаяся быстрым появлением газовых отеков, распадом тканей и сепсисом.

В медицине аналогичное заболевание называют газовой анаэробной инфекцией, газовой гангреной.

Протекает заболевание бурно и тяжело, смерть от токсемии.

Источник инфекции почва, где всегда присутствуют споры возбудителей. Способ заражения – раневой.

Возбудителей несколько: **Cl. septicum**, **Cl. oedematiens**, **Cl. sordellii**, **Cl. perfringens**, **Cl. histolyticum** очень редко **Cl.chauvoei**. Могут вызвать заболевание самостоятельно, но чаще совместно, даже с гнилостными клостридиями: **Bac. cereus**, **Cl. sporogenes**, от чего скорость распространения отека увеличивается, токсикоз усиливается.

Морфологические свойства. Грамположительные палочки с закругленными концами, имеют овальные споры. **Cl.histolyticum** тонкие длинные палочки, самые мелкие палочки среди них **Cl.septicum**. Все подвижные, кроме **Cl.perfringens**. Строгие анаэробы.

Культуральные свойства. Растут на клостридиальном бульоне с помутнением и газообразованием и кровяном глюкозном агаре. На среде Вильсона-Блера **Cl.perfringens** образует черные колонии и газообразование.

Факторы вирулентности. Образуют:

- экзотоксины – гистотоксин, воспаление с некрозом, гемолизин - разрушение эритроцитов;
- ферменты патогенности: гиалуронидазу, фибринолизин, коллагеназу.

Антигенные свойства. Отличаются друг от друга О-антигенами и экзотоксинами.

Устойчивость. Клетки выдерживают 5-минутное кипячение, споры – 15-минутное. В почве споры хранятся годами. Гибнут от 7%-ной H_2O_2 , 3%-ной надуксусной кислоты.

Лабораторная диагностика по МУ по лабораторному исследованию на злокачественный отек от 05.11.1984 г., № 115-6а.

Материал:

- клинический – содержимое отека;
- патологический – паренхиматозные органы.

Исследование на злокачественный отек включает:

- микроскопию мазков-отпечатков по Граму из материала;
- бактериологическое исследование;
- биопробу суспензии материала на морских свинках, которых заражают подкожно 0,5 – 1 мл, гибель через 16-48 часов с признаками заболевания, от погибших можно выделить возбудителей.

Иммунитет, биопрепараты. Иммунитет антитоксический. В неблагополучных местах применяют вакцину:

- концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против браздзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека и дизентерии ягнят.

Больных лечат, применяя хирургическую обработку, АБП, стартовый пенициллин, ЦС-группа.

В медицине заболевания с болезненным отеком подразделяют в зависимости от возбудителей на газовую гангрену (*Cl.perfringens*, *Cl.septicum*) и анаэробную инфекцию (бактероиды, фузобактерии). Для экстренной профилактики и лечения применяют поливалентную противогангренозную сыворотку и АБП. Для лечения анаэробной инфекции применяют метрогил внутривенно.

Возбудители браздзота

Острая неконтагиозная болезнь овец с геморрагическим воспалением сычуга и 12-перстной кишки, накоплением газов, сильной токсемией. Все заболевшие умирают

от токсемии, повреждающей почки, печень. Течение молниеносное, гибель за несколько часов.

Вспышки весной и осенью, когда пасут по зеленке, при наличие гельминтов у животных – стронгилят, паразитирующих в сычуге, тонком кишечнике.

Споры возбудителя в почве повсеместно. Способ заражения алиментарный.

Впервые заболевание изучил Крабе в 1875 году, в Норвегии и дал название «внезапная болезнь».

Возбудитель ***Cl. septicum***, а также ***Cl. perfringens Cl. novyi***.

Морфологические свойства. Грамположительные палочки, имеют овальные споры, строгие анаэробы. *Cl. septicum*, *Cl. novyi* – подвижные, *Cl. perfringens* – неподвижный.

Культуральные свойства. На кластридиальном бульоне помутнение и скопление газа, на кровяном глюкозном агаре колонии с гемолизом.

Факторы вирулентности. Образуют:

- экзотоксины – энтеротоксин - вызывает геморрагическое воспаление слизистой сычуга, отеки подкожной клетчатки, гемолизин – разрушает эритроциты;
- ферменты: фибринолизин, коллагеназа участвуют в разрушении тканей.

Антигенная структура. Имеют O-антигены видовые и H-антигены внутривидовые, но токсины одинаковые.

Устойчивость. Споры хранятся годами, выдерживают 15-минутное кипячение. 10%-ный гидроксид натрия, формальдегид, ОСГ - 1 час.

Лабораторная диагностика согласно МУ 115--6а по лабораторной диагностике брадзота овец 27.04.1984 г.

Материал патологический (сердце с кровью, инфильтраты, содержимое 12-перстной кишки. В лаборатории проводят:

- бактериоскопию;
- биопроба на белых мышах, морских свинках. Материалом заражают подкожно, гибель в течение 5 суток, из крови выделяют культуры, идентифицируют по морфологическим, культуральным свойствам.

Иммунитет, биопрепараты. Иммунитет антитоксический. Плановая вакцинация, применяют:

- концентрированную, поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека, анаэробной дизентерии ягнят;
- дегельминтизацию при выпасе по зеленке.

Заболевания, вызываемые Cl. perfringens

Cl. perfringens образует 6 типов экзотоксинов, преимущественно некротического действия. Известны такие типы: А, В, С, Д, Е, F.

Cl. perfringens типа А вызывает газовую гангрену у человека, злокачественный отек у животных, инфекционную анаэробную токсемию у телят, поросят.

Cl. perfringens типа В – возбудитель анаэробной дизентерии ягнят, болеют в первые 5 дней жизни геморрагическим гастроэнтеритом и токсемией. Клинически диарея с примесью крови, поражение печени, почек, все погибают.

Cl. perfringens типа Д, реже типа С – возбудитель инфекционной анаэробной энтеротоксемии у овец. Вызывает геморрагический гастроэнтерит и сильную токсемию от которой дистрофия почек, печени.

Cl. perfringens А, В, С, Д и Е возбудители энтеротоксемии крс у молодняка. Тяжелая форма от типа А.

Cl. perfringens типа F вызывает энтеротоксемию у цыплят.

Ведущий метод лабораторной диагностики обнаружение токсина в содержимом тонкого кишечника биопро-

бой на белых мышах или кроликах. Тип токсина определяют в РН на белых мышах с антитоксическими сыворотками против *Cl.perfringens*.

Для профилактики у новорожденных ягнят применяют антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии, а у взрослых концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека и анаэробной дизентерии ягнят.

Вопросы коллоквиума №4

1. Биологические свойства возбудителя пастереллеза.
2. Лабораторная диагностика, профилактика пастереллеза.
3. Возбудитель гемофилезного полисерозита.
4. Возбудитель гемофилезной (актинобациллезной) пневмонии.
5. Клинические формы колибактериоза у телят, птиц.
6. Биологические свойства *E.coli*, лабораторная диагностика эшерихиоза.
7. Антигенная структура, специфическая профилактика, лечение колибактериоза.
8. Сероварианты возбудителей сальмонеллеза, характеристика заболеваний.
9. Биологические свойства сальмонелл.
10. Лабораторная диагностика сальмонеллезоз, специфическая профилактика.
11. Биологические свойства возбудителя листериоза.
12. Лабораторная диагностика листериоза, биопрепараты, АБП.
13. Биологические свойства рожи свиней.
14. Лабораторная диагностика рожи, биопрепараты, АБП.

15. Возбудитель эмкара.
16. Возбудитель столбняка.
17. Возбудитель ботулизма.
18. Возбудители злокачественного отека.
19. Заболевания, вызываемые *C1.perfringens*.
20. Возбудитель некробактериоза.
21. Возбудитель копытной гнили.
22. Возбудители браздота.

ТЕМА 22

Лабораторная диагностика лептоспироза, кампилобактериоза, дизентерии свиней, биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами возбудителей кампилобактериоза, лабораторной диагностикой, биопрепаратами, АБП для профилактики и лечения. Разобрать лабораторную диагностику лептоспироза, кампилобактериоза, анаэробной дизентерии свиней, биопрепараты для диагностики, профилактики, лечения, АБП.

Оборудование и материалы. Таблицы, мазки возбудителей, питательные среды для культивирования, электронный ресурс «биологические свойства извитых», образцы биопрепаратов для профилактики, АБП, компоненты, посуда для РАВС.

Задание для самостоятельной работы. 1. Зарисовать морфологию возбудителей. 2. Познакомиться с методами диагностики, образцами биопрепаратов для диагностики, профилактики, лечения, АБП. 3. Поставить РАВС для диагностики кампилобактериоза крс.

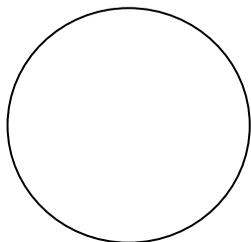


Рис. 25. Лептоспиры

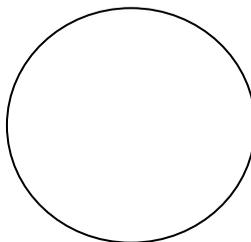


Рис. 26. Кампилобактерии

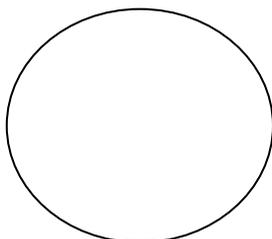


Рис. 27. *Treponema hyodysenteriae*

Лабораторная диагностика лептоспироза

У разных видов животных циркулируют разные серогруппы:

- крс: **Canicola, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi;**
- мрс: **Grippytyphosa, Hebdomadis, Pomona, Tarassovi, Sejroe;**
- лошадей: **Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa;**
- свиней: **Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Canicola, Sejroe;**
- пушные звери, собаки: **Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola.**

Для исследований используют материал:

- клинический (сыворотка крови больных);
- патологический (мертворожденный, почки, печень, мочевой пузырь с мочой).

В лаборатории проводят исследования согласно МУ по лабораторной диагностике лептоспироза 23.06.1992 и ГОСТ N 2240 от 27.12.91г.

- микроскопию раздавленной капли экссудата патматериала, мочи в темном поле, лептоспиры активно перемещаются;

- бактериологическое исследование, когда экссудат из патологического материала засевают на несколько пробирок с питательной средой, ставят в термостат на 3 месяца. Микроскопией обнаруживают лептоспир, снова пересевают, чтобы определить серогрупповую принадлежность лептоспир в РМА с групповыми агглютинирующими сыворотками, которые выпускают в двухнаборах: первый против 15 серогрупп лептоспир, второй против 20 серогрупп (предназначен для групповой идентификации лептоспир, выделенных из окружающей среды);

- биопроба на хомячках 20-30-дневного возраста или крольчатах-сосунах. Их заражают на 4-5 день умертвляют, делают посевы из внутренних органов. Целесообразно после заражения на 14-16 день взять кровь на сыворотку, поставить РМА с лептоспирами 13 серогрупп, если в разведении 1:10 будут антитела, значит во внутренних органах много лептоспир;

- серологическое исследование с сывороткой больных. Ставят РМА с лептоспирами 5-10 суточного роста 7-ми серогрупп, испытывают сыворотки в разведениях 1:25, 1:50, 1:1250. При взаимодействии с гомологичной сывороткой лептоспиры образуют клубки и замирают, учет в крестах, через 30 мин. Для племпродажи исследуют сыворотку крови свиней в разведении 1:25.

- РСК, РНГА, ИФА – экспериментальные реакции.

Иммунитет, биопрепараты. После переболевания напряженный, длительный иммунитет, может быть сопряжен с носительством, обладает серогрупповой специфичностью,

при внедрении другого сероварианта возникает ре-инфекция. Ведущее значение имеют IgG, после вакцинации маток у молодняка колостральный иммунитет 1,5 – 2,5 месяцев. Выпускают вакцины:

- депонированная поливалентная вакцина ВГНКИ против лептоспироза в двух вариантах. Вариант первый против помона, тарассови, иктерогеморрагии, каниколы, сейро (для свиней, мрс). Вариант второй против помона, тарассови, гриппотифоза, гебдомадис (для крс, лошадей);

- поливалентная вакцина против лептоспироза с/х и промысловых животных;

- вакцина против лептоспироза свиней лиофилизированная;

- вакцина против лептоспироза крс, овец лиофилизированная;

- вакцина поливалентная против лептоспироза собак. Выпускают гипериммунные сыворотки:

- против лептоспироза с/х и промысловых животных;

- сыворотка против лептоспироза.

Для лечения антибиотики пенициллинового ряда.

У человека циркулируют лептоспиры серогрупп: иктерогеморрагия, помона, гриппотифоза. У больных нарушения гемостаза, ДВС-синдром, ОПН, ХПН.

*Лабораторная диагностика кампилобактериозов по МУ
№01 157028-34 от 26.12.2008*

Возбудители – кампилобактерии – изогнутые палочки относят к отделу Gracilicutes, семейству Spirillaceae, роду *Campylobacter*, в составе рода виды и подвида:

- ***Campylobacter fetus venerealis*** циркулирует у крс, редко у человека;

- ***Campylobacter fetus fetus*** – возбудитель кампилобактериоза овец;

- ***Campylobacter jejuni*** – возбудитель кампилобактериоза взрослых и молодняка кур, человека;

- **Campylobacter bubulus** - сапрофит.

Материал патологический:

- мертворожденный и плаценту, исследуют голову, печень, легкие, плаценту;
- лимфоузлы таза, матку выбракованных, бесплодных коров.

Материал клинический:

- влагалищная слизь больных коров;
- слизь препуция, сперма;
- сыворотка крови овец.

В лаборатории проводят:

- бактериоскопию материала ориентировочно, обнаруживают кампилобактерии;
- люминесцентную микроскопию мазков отпечатков патологического и клинического материала с бивалентной люминесцирующей сывороткой для обнаружения патогенных и сапрофитных кампилобактерий. Возбудители ярко блестят;
- бактериологическое исследование, когда клинический и патологический материал сеют на ПЖА, СЖН. Идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам и в капельно РА с моноспецифическими агглютинирующими сыворотками;
- серологическое исследование у овец проводят с сывороткой крови, ставят РА с кампилобактериозным антигеном, диагностический титр 1:200, у крс ставят РАВС – РА с вагинальной слизью в разведении 1:1, 1:2, 1:4 1:8 с антигеном, разведенным 1:10, положительная реакция +++ или # креста.

Иммунитет, биопрепараты, АБП. У переболевших напряженный за счет Ig и носительства возбудителя в матке, препуции, а у овец и в желчном пузыре, напряженность у крс 9 месяцев, у мрс 3 года.

Для профилактики заболевания для крс и овец выпускают эмульсин-вакцину.

Лечение эндометритов включает внутриматочное введение эмульсии пенициллина и стрептомицина 2 раза в сутки в течение 4 дней, внутримышечное введение нитокса, тилозина.

Птицам выпаивают энрофлон, с кормом фуразолидон или выпаивают нифурпазин.

Методика постановки РАВС

Слизь у больных берут марлевым тампоном, в пробирке с 5 мл 3%-ного формализованного раствора хлорида натрия, выдерживают 12-14 часов при $+1 - 4^{\circ} \text{C}$. Тампон отжимают центрифугируют, с экстрактом ставят РАВС в четырех разведениях.

Таблица 24 – Методика постановки РАВС

| Компоненты | Объем компонента в пробирке | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 3%-ный раствор хлорида натрия | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Экстракт слизи | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Антиген | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

Ставят контроли:

1. Антиген в 3%-ном растворе хлорида натрия по 0,5 мл.
2. Антиген и положительная сыворотка первого серотипа в разведении 1:100.

Вначале учитывают результаты контроля: в первом отрицательный, во втором положительный. Положительный результат исследований – реакция на +++ или # креста в разведении 1:1 – 1:8.

Лабораторная диагностика дизентерии свиней согласно с МУ по лабораторной диагностике 25.11 1983 №115-69

Возбудитель *Treponema (Serpulina, Borrelia) hyodysenteria*

Материал для исследований от больных - фекалий со слизью, кровью, от погибших - слизистая оболочка с поражениями, берут соскобы.

В лаборатории проводят:

- микроскопию раздавленной капли в темном поле, фазовоконтрастную, обнаруживают 5-10 трепонем. Можно приготовить мазки окрасить фуксином, обнаруживают фрагменты трепонем;

- биопроба на кролике, которого заражают внутрибрюшинно фильтратом фекалий, соскоба в дозе 5-7 мл, через 7-10 дней берут содержимое брюшной полости, если обнаруживают трепонем, кролика умертвляют, делают посеы экссудата брюшной полости на элективные питательные среды;

- РИФ с патологическим и клиническим материалом.

Иммунитет. У переболевших может быть реинфекция. Биопрепаратов нет. Для лечения применяют химиотерапевтические средства:

- осарсол по 0,5 г в 1%-нос содовом растворе 2 раза в день;

- ронидазол 10%-ный раствор 60г на 100 л воды в течение 3-х дней.

- ветдипасфен 125-725 мг 1 раз в день;

- нифулин 5кг /т корма 2 раза в день;

- тилан 2,5 мг/кг массы с водой;

- трихопол по 0,5 г 2 раза в день.

Курс лечения 5 дней, через 7-10 дней повторить.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Биологические свойства возбудителя лептоспироза.
2. Лабораторная диагностика лептоспироза.
3. Биопрепараты и АБП при лептоспирозе.
4. Возбудитель анаэробной дизентерии свиней.
5. Возбудители кампилобактериоза.

ТЕМА 23

Лабораторная диагностика Ку - риккетсиоза, хламидиозов животных, биопрепараты. Патогенные микоплазмы

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами, лабораторной диагностикой, биопрепаратами, средствами лечения микоплазмозов. Разобрать лабораторную диагностику Ку-риккетсиоза, хламидиозов животных. Ознакомиться с биопрепаратами для диагностики, профилактики, средствами лечения.

Оборудование и материалы. Электронный ресурс «Биологические свойства микоплазм, риккетсий, хламидий», взвеси хламидиозного и риккетсиозного диагностикомов, мазки микоплазм, РСК для диагностики хламидиозов готовая к учету, образцы вакцин, АБП для лечения.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести микроскопию мазков риккетсий, хламидий по Романовскому Гимза, зарисовать морфологию возбудителей. 2. Провести микроскопию мазков микоплазм, окрашенных ориентировочно, результат зарисовать. 3. Учесть результаты РСК. 4. Познакомиться с образцами вакцин, диагностикомов, АБП.

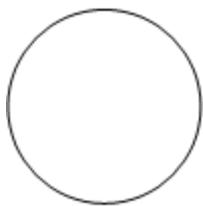


Рис. 28.

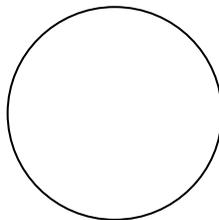


Рис. 29.

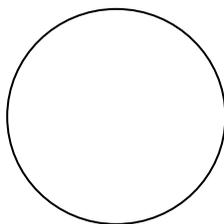


Рис. 30.

Лабораторная диагностика микоплазмозов

Микоплазмы – свободноживущие, бесклеточные микроорганизмы.

Таксономия: относится к отделу Tenericutes, класс Mollicutes, пор. Mycoplasmatales, семейство Mycoplasmataceae, род Mycoplasma включает 64 вида, среди которых возбудители *M. mycoides*, *M. agalactia*, *M. gallisepticum*.

Таблица 25 - Лабораторная диагностика, профилактика микоплазмозов

| Характеристика | Перепневмония крс (ПВЛ) | Агалактия коз | Респираторный микоплазмоз |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Клинические признаки заболевания | Эксудативная плевропневмония | Мертворожденные, септицемия у коз и козлят, артриты, маститы | Фибринозный аэросоккулит |

Продолжение таблицы 25

| | | | |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Лабораторная диагностика | Эксудат гр.полости, сыворотки крови. 1. Биопроба на телятах ч/з 2 – 3 пассажа, можно выделить культуру 2. РСК сыворотки крови | Головной мозг, пор.органы, л/узлы, сыворотка крови 1. Бактериоскопия 2. Бактериологические исследования 3. Биопроба на козлятах 4. РСК, РДСК | Соскобы трахеи, головной мозг 1. Микробиологическое исследование, заражение КЭ, обнаружение бактериоскопически 2. Кровяно – капельная реакция агглютинации. 3. ИФА с сывороткой крови, - |
| Биопрепараты | Живая вакцина из штамма T ₁ | Живая вакцина из штамма Ag ₁ (Румогн) | Инактивированная, эмульгированная вакцина Нарвак, инактивированная, эмульгированная вакцина. АВИВАК – РМ из штамма S ₆ , |
| Лечение | Нитокс, тилозин, энроксил, тиломаг, эритромицин, драксин | | Окситетрацилин, тилан, драксин, эритромицин, меропинем |
| Кормовые добавки | Биовит, фрадизин для профилактики в неблагополучных хозяйствах | | |

Лабораторная диагностика Ку-риккетсиоза по Ветеринарным правилам (ВП) 13.3.1221-96

Возбудитель Ку-риккетсиоза (Ку-лихорадки, Q лихорадка от англ queer, странный, необычный) -**Coxiella burnetii** названы в честь Х. Кокса, впервые выделившего возбудителя, в 1938 году.

Материал для исследований:

- патологический – мертворожденный;

- клинический – сыворотка крови больных.

В лаборатории проводят:

- микроскопию мазков отпечатков по Романовскому - Гимза экссудата, внутренних органов мертворожденных, обнаруживают риккетсий;

- биопробу на морских свинках, белых мышах суспензией патологического материала, заражая внутрибрюшинно, через 3-5 слепых пассажей гибель, при микроскопии внутренних органов обнаруживают риккетсий;

- микробиологическое исследование, когда заражают куриные эмбрионы (КЭ) в желточный мешок, через 4-6 слепых пассажей гибель с накоплением риккетсий в желточном мешке;

- серологическое исследование, ставят РСК, РДСК с сывороткой крови в разведении 1:10 обследуемых и риккетсиозным диагностикумом.

Вакцины не разрабатывались, для лечения препараты тетрациклина и макролиды: драксин, тилозин.

*Лабораторная диагностика хламидиозов по МУ
по лабораторной диагностике хламидийных инфекций
30/06 1999 13-7-463*

Возбудители хламидиозов относят к родам **Chlamidia** и **Chlamidophilus**.

У свиней заболевание вызывает **Chlamidia suis**, у кроликов **Chlamidophila abortus**, у птиц и человека **Chlamidophila psittaci**.

Материал для исследований:

- патологический – мертворожденный;
- клинический – сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- микроскопию мазков-отпечатков патологического материала, обнаруживают хламидий;

- микробиологическое исследование суспензией пат-

материала заражают КЭ в желточный мешок на 5-7 день гибель с накоплением хламидий в желточном мешке.

▪ серологическое исследование, ставят РСК (РДСК) с сывороткой крови и хламидийным диагностикумом.

Для профилактики заболеваний выпускают вакцину против хламидиоза животных инактивированную, эмульгированную. Для лечения препараты тетрациклина и макролиды: драксин, тилозин. Эффективен доксициклин, устойчивы к препаратам ЦС-группы.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии:

1. Патогенные микоплазмы.
2. Возбудитель Ку-лихорадки.
3. Возбудители хламидиозов животных.

ТЕМА 24

Возбудители аспергиллеза. Лабораторная диагностика трихофитии, микроспории, биопрепараты

Цель занятия. Ознакомиться с биологическими свойствами, лабораторной диагностикой, аспергиллеза, средствами лечения. Разобрать лабораторную диагностику трихофитии и микроспории животных. Ознакомиться с биопрепаратами для профилактики, средствами лечения.

Оборудование и материалы. Электронный ресурс «Аспергиллезы животных», посевы аспергилл, трихофитонов, образцы вакцин, фунгицидных средств для лечения.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести микроскопию мицелия аспергилл, трихофитонов, зарисовать морфологию возбудителей. 2. Познакомиться с культуральными свойствами трихофитонов, аспергилл, образцами вакцин, фунгицидными средствами.

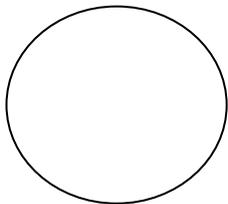


Рис. 31.

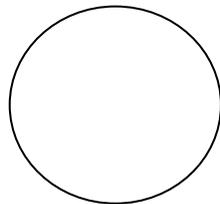


Рис. 32.

Возбудители аспергиллеза

Аспергиллез заболевание птенцов, млекопитающих с поражением органов дыхания.

У птенцов аэросаккулит, грануломатозная пневмония, редко, если пневмония не развивается может быть диарея, параличи конечностей, цыплята не растут. У КЭ гибель от поражения легких.

У крс, лошадей поражаются верхние дыхательные пути, затем бронхи и легкие.

Клинически у всех больных кашель, одышка, у птенцов гибель от асфиксии.

Источник инфекции почва, корма, много спор во влажном и запыленном воздухе помещений.

Способ заражения - аэрогенный.

Впервые плесневые грибы в легких и воздухоносных мешках у птиц обнаружил А. Мейер в 1815 году, Г. Фрезениус выделил грибок 1855 году и назвал его *A.fumigatus*, заболевание получило название аспергиллез.

Возбудители грибы относят к царству *Fungi* отделу *Eumycota*, подотделу *Dentromycetes*, семейству *Aspergillaceae*, роду *Aspergillus*, виды *A.fumigatus*, *A. niger*, *A.parasiticus*, *A.flavus*.

Морфологические свойства. Гифы разветвленные, септированные, конидии круглые, конидиеносцы с головками.

Культуральные свойства. Растут на среде Чапека, Сабуро в течение 7-10 дней при температуре 20 – 30⁰ С, обра-

зую пушистые колонии сине - зеленого, бурого, черного, желтого цвета.

Факторы вирулентности. Экзотоксины.

Устойчивость. В помещении споры сохраняются 5 лет. Погибают при 100⁰ С за 5 10 мин. В 10% -ном едком натрии, галоидах погибают за несколько часов, в формалине – за 40 мин, 2%-ном 3Д-Септе, дезолайне за 1 час.

Лабораторная диагностика

Материал:

- легкие погибших цыплят, КЭ;
- носовой экссудат млекопитающих.

В лаборатории проводят:

- микроскопию раздавленной капли материала, обнаруживают споры, конидиеносцы с головками;
- микологическое исследование, когда пораженные участки легких, раскладывают на среду Чапека или Сабу-ро. Экссудат сеют на те же среды, через 5-7 дней вырастают колонии, которые идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам.

Специфическая профилактика не разработана. Меры борьбы с аспергиллезом птенцов проводят в соответствии с Рекомендациями ВНИВИП по профилактике и мерам борьбы с аспергиллезом птиц. СПб-Ломоносов 1996 г., Методическими указаниями по применению аэрозолей химиотерапевтических и дезинфицирующих препаратов для профилактики и терапии болезней птиц, разработанные Б.Ф. Бессарабовым. М., 2006 г., которые включают:

- обеззараживания яйца при поступлении на яйцесклад аэрозолем формалина в течение 40 мин, перед закладкой в инкубатор и третий раз парами формальдегида КЭ в течение 5 мин перед наклевом;
- при появлении заболевания на объекте внутрь назначают нистатин, леворин, аэрозольно применяют йодтриэтиленгликоль или аэрозоль амфотерицина в течение 3 дней;

- для лечения млекопитающих амфотерицин применяют внутривенно.

Лабораторная диагностика трихофитии по МУ ГУВ МС СССР 18.-3.1980 г.

Возбудители грибы из рода Trichophyton:

- у крс и оленей **T.verrucosum (Tr.faviformae)**;
- у лошадей **Tr.equinum** и **Tr.mentagrophytes**;
- у плотоядных **Tr.mentagrophytes**.

Материал клинический: волосы из мест поражения, в лаборатории проводят:

- микроскопию раздавленной капли волоса в 10%-ном гидроксиде натрия под увеличением х40, обнаруживают споры, расположенные вокруг волоса, редко внутри;
- микологическое исследование, когда пораженные волосы раскладывают на среду Чапека или Сабуро, вырастают специфические колонии.

Для профилактики и лечения диссеминированной формы заболеваний применяют:

- вакцину ЛТФ;
- вакцину Триховак.

Для местного лечения применяют: препарат РОСК, мазь Юглон, салициловую мазь, мазь «Ям», линимент гризифульвина. Внутрь применяют низорал, «Монкловит».

Лабораторная диагностика микроспории

Возбудители грибы из рода Microsporum, В составе рода три вида:

- **M.canis, (M.lanosum)** циркулирует у плотоядных, кроликов, нутрий, человека;
- **M.equinum** – у лошадей;
- **M.gypseum** – у плотоядных, крыс, лошадей, у человека заболевание не вызывает.

Материал клинический: волосы из мест поражения, в лаборатории проводят:

- просмотр под УФЛ с фильтром Вуда, волосы, пораженные спорами возбудителя ярко блестят;
- микроскопию раздавленной капли волоса в 10%-ном гидроксиде натрия под увеличением $\times 40$, обнаруживают мелкие спора, расположенные вокруг и внутри волоса;
- микологическое исследование, когда пораженные волосы раскладывают на среду Чапека или Сабуро, вырастают специфические колонии.

Для профилактики и лечения заболевания применяют:

- вакцину Вакдерм против трихофитии (Т) и микроспории (М) для собак, кошек, пушных зверей, кроликов;
- инактивированную вакцину Поливак ТМ, для профилактики Т и М у лошадей, собак и кошек;
- вакцину эквидерм против Т и М у лошадей;
- вакцину Пушвак против Т и М пушных зверей;
- вакцину Миканис против Т и М плотоядных.

Для лечения применяют и фунгицидные средства:

- внутримышечно 10%-ную суспензию тримицида;
- внутримышечно дермикоцид 1 раз в 5 дней, несколько инъекций, затем вакцину Поливак ТМ. Обязательно назначают с дермикоцидом витамины А, Д, группы В;
- местно мазь Ям (содержит крезол), если количество очагов достигнет трех.

Вопросы для обсуждения на следующем занятии

1. Возбудитель аспергиллеза.
2. Возбудители трихофитии.
3. Возбудители микроспории.
4. Возбудитель афлатоксикоза.
5. Возбудители охратоксикоза.
6. Возбудители Т₂ –токсикоза.
7. Возбудители зеароленотоксикоза.

ТЕМА 25

Лабораторная диагностика микотоксикозов, способы профилактики, лечения

Цель занятия. Разобрать лабораторную диагностику микотоксикозов, способы профилактики, лечения.

Оборудование и материалы. Электронный ресурс «биологические свойства возбудителей микотоксикозов», посеvy грибов, препараты для микроскопирования, препараты для лечения.

Задание для самостоятельной работы. 1. Провести микроскопию колоний грибов и идентификацию. 2. Зарисовать результаты микроскопии. 3. Познакомиться с образцами лекарственных средств для лечения микотоксикозов.

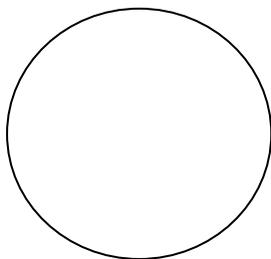


Рис. 33.

Лабораторная диагностика афлатоксикоза по ГОСТ31748-2012

Возбудители афлатоксикоза животных грибы видов **Aspergillus flavus** и **As.parasiticus** – продуцентов афлатоксинов: В₁₋₂, G₁₋₂, М₁₋₂.

В лабораторию посылают пораженный корм, погибших птиц, проводят:

- вскрытие погибших, обнаруживают гастроэнтероколит, дистрофию печени с очагами некроза, дистрофию миокарда;

- визуальное исследование, обнаруживают желтый налет;
- микроскопию раздавленной капли налета пораженных кормов, обнаруживают споры, конидиеносцы с головками;
- микологическое исследование, делают посев, выделенные колонии идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам, результат исследований в течение 10-15 дней;
- газожидкостную хроматографию, масспектрометрию экстракта корма, мицелия гриба с количественным определением и идентификацией афлатоксина.

*Лабораторная диагностика охратоксикоза
по Методическим рекомендациям Минсельхоза России*

Возбудители охратоксикоза грибы **Aspergillus ochraceus**, **Penicillium viridicatum** – продуценты охратоксинов типа А.В.С.Д.

В лабораторию посылают пораженный корм, внутренние органы погибших, трупы птиц проводят:

- вскрытие погибших, обнаруживают гастроэнтероколит, цирроз печени, гиалиновую дегенерацию, кисты почек;
- визуальное исследование, обнаруживают желтый, коричневый светло-зеленый налет;
- микроскопию раздавленной капли налета пораженных кормов, обнаруживают споры, конидиеносцы с головками, кисточками;
- микологическое исследование, делают посев, выделенные колонии идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам, результат исследований в течение 10-15 дней;
- биопробу на кролике с эфирной вытяжкой исследуемого материала, возникает дерматит;
- газожидкостную хроматографию, масспектромет-

рию экстракта корма, мицелия гриба с количественным определением и идентификацией охратоксинов.

Лабораторная диагностика фузариотоксикозов

Возбудители грибы фузарии: **Fusarium sporotrichiella, F. graminearum, F. roseum** – продуценты трихотеценовых токсинов: T₂, DAS, DON, вызывающих T₂ токсикоз и токсина F₂ возбудителя F₂ токсикоза (зеараленонотоксикоза).

В лабораторию посылают пораженный корм, проводят:

- визуальное исследование, обнаруживают серый, красный, розовый, оранжевый налет;
- микроскопию раздавленной капли налета пораженных кормов, обнаруживают макроконидии серповидной формы;
- микологическое исследование, делают посев, выделенные колонии идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам, результат исследований в течение 10-15 дней;
- биопробу на кролике, втирают водную вытяжку корма, возникает дерматит;
- газожидкостная хроматография, масспектрометрия экстракта корма, мицелия гриба с количественным определением и идентификацией трихотеценовых токсинов.

Лабораторная диагностика стахиботриотоксикоза

Продуцент стахиботриотоксина **Stachybotrys alternans**, син. **St. atra**.

В лабораторию посылают пораженный корм, от погибших берут печень, сгустки крови, костный мозг, проводят:

- визуальное исследование материала, обнаруживают черный сажистый налет;
- микроскопию раздавленной капли налета пораженных кормов, обнаруживают овальные споры, конидиеносцы со стеригмами;

- микологическое исследование, делают посев, выделенные колонии идентифицируют по культуральным и морфологическим свойствам, результат исследований в течение 10-15 дней;

- биопробу на кролике, когда эфирную вытежку исследуемого материала втирают в скарифицированную кожу кролика, через 3-4 суток воспаление, потом некроз и гибель.

Лабораторная диагностика микотоксикозов по Методическим указаниям от 2014 г.

Профилактика микотоксикозов

Биопрепаратов для профилактики микотоксикозов нет. Профилактика включает мероприятия:

- Борьбу с токсическими грибами, поражающими растения во время вегетации:

- обработка растений против фитопатогенных грибов;
- высушивание кукурузы в течение 24 часов после уборки до влажности 14%;

- косить сено до цветения;
- не выпасать животных по старой перезимовавшей траве и по молодой, поврежденной заморозками;

- запахивать осенью растительные остатки.

- Правильную уборку урожая и хранения кормов:

- зерно убирать в сухом виде, хранить при влажности 14-15%, просушивать сразу после уборки;

- не использовать перезимовавшее зерно, сено, солому.

- Консервирование кормов:

- зерна - 2,5%-ным раствором пропионовой кислоты, препаратами из смеси карбоновых кислот, обрабатывают фуражное зерно влажностью 16-35%, сохраняется 12 месяцев;

- соломы, сена - 30%-ным водным раствором аммиака;

- воздействием низких температур.

- Обеззараживание подозрительных кормов:
 - сена, соломы - орошением 20%-ным аммиаком в течение 7 суток;
 - сена, соломы - обработкой газообразным аммиаком в параформалиновой камере;
 - соломы - смачиванием негашеной известью в течение 10 мин;
 - зерна - 8,4%-ным бисульфитом натрия;
 - прожигание зерна на АВМ, в зерносушилке;
 - вымачивание зерна в горячей воде;
 - УФ-облучение кормов, через 15 мин погибает 50-65% микрофлоры, грибы через 30 мин.

Лечение микотоксикозов

Лечение симптоматическое. Тактика лечения микотоксикозов включает:

- Выведение токсинов из желудочно-кишечного тракта:
 - промывание желудка у лошади, рубца у жвачных, клизмы;
 - клизмы у свиней, плотоядных;
 - назначение адсорбентов всем видам млекопитающих и птицам, используют активированный уголь, полифепан, полисорб;
 - назначение слабительных препаратов: вазелинового или касторового масел.
- Освобождение организма от яда включает:
 - водную детоксицирующую нагрузку (гемодез, 5%-ный раствор глюкозы, раствор трисоли) и форсирование диуреза с использованием осмодиуретиков и салуретиков.
- Назначение гепатопротекторов: эссенциале форте, аскорутин, птице назначают гамма-аминомасляную кислоту, аскорбиновую кислоты, метионин и фосфорную кислоту.

Для лечения F₂ - токсикоза применяют прогестерон

для нейтрализации эстрогенного синдрома, клизмы, адсорбенты.

***Вопросы коллоквиума №5 по разделу
«Патогенные извитые, риккетсии, хламидии,
микоплазмы, грибы»***

1. Биологические свойства лептоспир.
2. Лабораторная диагностика лептоспироза, биопрепараты.
3. Биологические свойства кампилобактерий.
4. Лабораторная диагностика кампилобактериоза, биопрепараты.
5. Возбудитель анаэробной дизентерии свиней.
6. Возбудитель Ку-лихорадки.
7. Патогенные микоплазмы.
8. Возбудители хламидиозов.
9. Возбудители трихофитии.
10. Возбудители микроспории.
11. Возбудитель афлатоксикоза.
12. Возбудители аспергиллеза.
13. Возбудители охратоксикоза
14. Возбудители фузариотоксикозов.
13. Профилактика и лечение микотоксикозов.

ТЕМА 26

**Санитарно-бактериологическая и микологическая
оценка кормов**

Цель занятия. Освоить методы санитарно-бактериологического и микологического исследования комбикорма, мясокостной, рыбной муки, силоса, фуражного зерна, грубых кормов. Выполнить отдельные этапы исследований. Учесть и дать анализ полученным результатам.

Оборудование и материалы. Посевы кормов, питательные среды для посева кормов (ПБ, агар МАфАМ, агар Чапека) образцы кормов, раствор резазурина, физраствор, пробирки, пипетки, чашки Петри.

Задание для самостоятельной работы. 1. Поставить резазуриновую пробу с комбикормом. 2. Освоить методику определения микробного числа комбикорма, провести учет посевов комбикорма. 3. Освоить методику определения количества спор грибов в комбикорме, провести учет посевов. 5. Посеять зерно, сено на среду Чапека, провести учет посевов. 6. Посеять сено на среду Чапека, провести учет результатов.

Таблица 26 – Санитарно-микробиологический анализ Кормов

| Тесты | Демонстрационный образец | Опытный образец |
|------------------------|--------------------------|-----------------|
| Резазуриновая проба | | |
| Микробное число КОЕ/г | | |
| Количество спор грибов | | |
| Виды грибов зерна | | |
| Виды грибов сена | | |

Санитарно-бактериологическая оценка комбикорма, мясокостной и рыбной муки по Правилам бактериологического исследования кормов 10.06 1975

Выпускаемый комбикорм, мясокостная, рыбная мука подлежат, согласно Ветеринарного законодательства, бак-

териологическому исследованию, цель которого определить микробное число (КОЕ/г), исключить присутствие сальмонелл, патогенных эшерихий, патогенных анаэробов.

Использование загрязненных комбикормов, мясокостной и рыбной муки вызывает дисбактериоз с последующим развитием желудочно-кишечных заболеваний, от которых особенно страдают молодняк птиц и свиней.

От присутствия в кормах сальмонелл у птиц развивается транзитное носительство с последующим инфицированием птицепродуктов, отчего у человека возникает токсикоинфекция или интоксикация.

Возбудители, присутствующие в кормах, вызывают заболевания у всех видов животных.

Для санитарно-бактериологической оценки в лабораторию посылают образец массой 500г. Средний образец составляют:

- при незатаренной продукции из 20 мест;
- при затаренной до 10 упаковок – из каждой десятой, если объем до 100 упаковок берут из каждой десятой, если упаковок больше 100, то берут по 3 образца от 100 упаковок.

В лаборатории определяют микробное число, количество микробов в 1 г корма (КОЕ/г), для этого готовят разведения корма в стерильном физрастворе: 1:10, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , затем 1 мл каждого разведения сеют в питательный агар глубинным способом, посеvy ставят в термостат при $+37^{\circ}\text{C}$ на 48 часов. В конце культивирования подсчитывают количество выросших колоний, умножают на разведение и делят на количества учтенных разведений. Микробное число должно составлять до 500 тыс. КОЕ/г.

Санитарно-бактериологическое состояние мясокостной, рыбной муки можно определить резазуриновой пробой (ориентировочный метод), когда в 10 мл питательного бульона (ПБ) в прорбирках вносят 1 г муки и 1 мл 0,1%-

ного резазурина, встряхивают, ставят в термостат при +37⁰ С. Определяют цвет пробы, если розовое окрашивание появляется после 2 часов наблюдения, санитарно-бактериологическое состояние удовлетворительное, если до 2 часов наблюдения – неудовлетворительное, требуется повторная термическая обработка.

В комбикормах, рыбной и мясокостной муке исключают сальмонеллы, патогенные эшерихии. Для этого 50 г образца сеют в питательный бульон с 5% маннита, в соотношении 1:5, через 5 часов взбалтывают, отстаивают и пересеваяют в селенитовую среду в соотношении 1:5, через 16-18 часов колонии, похожие на сальмонелл и эшерихий отсеивают на ПБ и ПА в пробирки. Полученные чистые культуры идентифицируют до вида посевом на среды: Гисса, Клигера, Симмонса, трехсахарный агар, Пб с индикаторными бумажками.

Таблица 27 – Биохимическая характеристика сальмонелл и эшерихий

| Тесты | Сальмонеллы | Эшерихии |
|------------------------------|-------------|----------|
| Расщепление лактозы | - | + |
| Усваивание цитрата | + | - |
| Расщепление маннита | + | + |
| Образование H ₂ S | + | - |
| Образование индола | - | + |
| Расщепление мочевины | - | - |

Серовариант сальмонелл определяют в капельной РА с диагностическими сальмонеллезными поливалентными и моноклепторными сыворотками.

Бульонные культуры эшерихий проверяют на патогенность биопробой на белых мышах, гибель мышей, зараженных внутрибрюшинно, в течение 3 суток.

Бактериологическое исследование на анаэробы проводят с целью исключения *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*. Делают посев 50 г образца на клостридиальный бульон, потом на кровяной глюкозный агар по Цейсслеру, молоко, среду Вильсена-Блера.

В комбикормах, мясокостной, рыбной муке не должно быть сальмонелл, патогенных эшерихий, токсинообразующих анаэробов.

Микологический анализ комбикормов, мясокостной и рыбной муки

Проводят согласно ГОСТ 13496.6-71 «Комбикорм. Методы выделения микроскопических грибов». Материалом служит 10 г образца, который помещают в колбу, где 100мл стерильной дистиллированной воды, 0,1% твина, колбу встряхивают в течение 15-20 мин, затем делают разведения 10^{-2} и 10^{-3} в стерильном физрастворе. Разведение 10^{-3} по 1 мл сеют на 3 чашки со средой Чапека, ставят в термостат на 10 суток при $+25^{\circ}\text{C}$.

Через 5-6 дней и позже подсчитывают количество колоний, умножают на разведение, находят сумму, делят на количество чашек. Допускается 2000 спор в 1 г корма.

Проводят идентификацию выросших колоний грибов по культуральным, морфологическим свойствам и по токсичности на простейших или кожной пробой на кролике. Материал для биопробы мицелий грибов. Для этого 10-дневную культуру выдерживают при $+5^{\circ}$, $+7^{\circ}$ в течение 15-30 суток, подсушивают при $40-45^{\circ}$, измельчают, наносят на кожу кролика. Токсичность можно определить физико-химическими методами.

В комбикормах, мясокостной и рыбной муке не должно быть *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium viridicatum*, *Claviceps purpurea*, *Cl. paspali*, *Fusarium graminearum*, *F. sporotrichiella*, *Stachybotrys alternans* и др.

Санитарно-бактериологическая оценка силоса

Качество силоса определяют визуально, если обнаруживают запах прогорклого масла, исключают *Cl.botulinum* и его токсины. Для этого в лабораторию отправляют образец 500 г, взятый из 20 мест силосной массы.

Образец заливают стерильным физраствором в соотношении 1:4, настаивают 2 часа, фильтруют, заражают 2 белых мышей внутрибрюшинно, одну морскую свинку – подкожно.

Фильтрат прогревают на кипящей водяной бане в течение 20-30 мин и заражают 2 белых мышей и свинку. При наличии ботулинического токсина животные, зараженные сырым (некипяченым) экстрактом, погибают на 2-5 сутки с характерными клиническими признаками (шаткая походка, учащенное дыхание, западение брюшной стенки).

После обнаружения ботулинического токсина ставят реакцию нейтрализации (РН) вначале со смесью ботулинических сывороток, когда в пробирку наливают по 0,2 мл ботулинические сыворотки разных типов, затем 1 мл фильтрата силоса, выдерживают 37⁰ С в течение 30 мин, вводят мышам внутрибрюшинной, они остаются в живых.

С помощью РН можно определить тип ботулинического токсина. В живых остаются мыши при соответствии типа токсина сыворотке.

Силос, в котором обнаружен токсин возбудителя ботулизма уничтожают.

Микологическое исследование фуражного зерна

Зерно может быть заражено спорами грибов на поверхности (заспoreние) и когда споры под оболочкой (глубинное поражение).

Заспoreние (поверхностное) заражение устанавливают посевом 10 зерен на среду Чапека в чашку Петри, чтобы установить заспoreние *Aspergillus fumigatus* раскладывают на среду Чапека 20 зерен.

Для выявления глубинного поражения, зерно, завернутое в марлевую салфетку, помещают в стаканчик с 3%-ным раствором формальдегида или сулемы в концентрации 1:1000, экспозиция взаимодействия 2-3 мин, промывают дистиллированной водой с добавлением к 50 мл 2-3 капель 5%-ного раствора аммиака. После контакта с формалином зерно промывают однократно, после сулемы – трехкратно, раскладывают 50 зерен на среду Чапека. Посевы выдерживают в термостате при температуре 22-25 °С в течение 10 дней.

В зерне не должно быть грибов *Fusarium sporotrichiella*, *F. Graminearum*, *Stachybotrys alternans*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*.

Микологическое исследование грубого корма

Проводят по ГОСТ 18057-72 «Корма грубые. Методы выделения микроскопических грибов».

Стерильными ножницами нарезают кусочки сена, соломы, длиной 2 см, стерильным пинцетом раскладывают 10 кусочков на среду Чапека, в чашку Петри. Посевы выдерживают в термостате при температуре 22-25 °С в течение 10 дней. Вид выросших колоний определяют по культуральным, морфологическим, токсигенным свойствам.

Очень опасны такие токсигенные грибы как *Stachybotrys alternans*, *Pithomyces chartarum*, *Claviceps purpurea*, *Cl. paspali*.

ТЕМА 27

Санитарно-микробиологическая оценка кисломолочных продуктов, сливочного масла, сыров (самостоятельная работа)

Цель занятия. Познакомиться с микрофлорой, санитарно-бактериологическим контролем кисломолочных продуктов, сливочного масла сыров.

Оборудование и материалы. Стерильные, пробирки, пипетки, физраствор, образцы кисломолочных продуктов, среда Кесслер, посевы комбикорма, сена, соломы, зерна готовые к учету.

Задание для самостоятельной работы. Провести учет посева кормов, дать заключение о санитарном качестве, результаты записать в таблицу 5. 2. Познакомиться с микрофлорой кисломолочных продуктов, методами санитарно-бактериологической оценки. 3. Провести микроскопию кисломолочных продуктов (йогурта, сметаны), результат зарисовать. 4. Провести санитарно-бактериологическое исследование йогурта, сметаны.

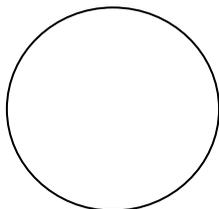


Рис. 34.

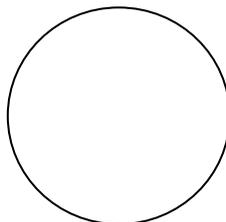


Рис. 35.

Микрофлора кисломолочных продуктов, санитарно-бактериологическая оценка

Различают кисломолочные продукты гомоферментативного и смешанного молочнокислого брожения. В продуктах гомоферментативного брожения содержится преимущественно молочная кислота, а продуктах смешанного брожения – молочная кислота, этиловый спирт, углекислый газ или - молочная и уксусная кислоты.

К гомоферментативным кисломолочным продуктам относят:

- простоквашу обыкновенную, получают сквашивая молоко *Streptococcus lactis*, а *Lactobacillus bulgaricus* применяют для уплотнения сгустка;

- болгарскую простоквашу, более кислая и тягучая, получают используя *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*;
- ряженку, когда томленная смесь молока и сливок заквашивается *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*;
- сметану – сливки, сквашенные *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*;
- творог, для приготовления которого используют закваску сметаны;
- ацидофильную простоквашу – диетический продукт, полученный сквашиванием молока *Lactobacillus acidophilus*;
- ацидофилин, получают сквашивая молоко *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus lactis*.

К кисломолочным продуктам смешанного брожения относят:

- кефир, получают сквашивая молоко кефирными грибами - естественным симбиозом *Saccharomyces lactis*, *Lactobacillus lactis*, уксуснокислых бактерий, разных молочнокислых стрептококков. В свежем продукте содержится в основном молочная кислота, со временем накапливается спирт, уксусная кислота;
- кавказский кефир – молоко с добавлением сахара, сквашенное кефирными грибами;
- кумыс – молоко кобыл, сквашенное *Saccharomyces lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*;
- напитки «Бифидин», «Угличский» содержат бифидобактерии и молочнокислые стрептококки;
- йогурт содержит *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* и бифидобактерии.

Контроль качества проводят по Сан Пин 2.3.4 551-96 «Производство молока и молочных продуктов» и Межгосударственному стандарту «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа» 1986-01-01. Огра-

ничения срока действия снято Постановлением Госстандарта 28.12. №2330.

Исследования включают:

- органолептическое исследование;
- бактериоскопию, обнаруживают только бактерий, составляющих закваску, в твороге допустимы единичные дрожжи и палочки;
- бактериологическое исследование, когда делают посев готового продукта или его разведений на 5 мл среды Кесслер с целью исключения БГКП (бактерий группы кишечных палочек, протеев, энтеробактера, цитробактера, клебсиелл, серратий). В $0,00001\text{см}^3$ кисломолочных продуктов не должно содержаться БГКП.

Микрофлора сливочного масла, санитарно-бактериологическая оценка

Масло – концентрат молочного жира, изготавливают из свежих или сквашенных сливок. Самые качественные виды масла: вологодское и любительское готовят с промыванием, содержат 80% жира. Крестьянское сливочное масло содержит пахту, жира 71%, много влаги.

Присутствие микрофлоры в сладкосливочном масле нежелательно, чем ее меньше, тем выше качество, достигается надежной пастерезацией сливок, упаковкой, хранением при $-18-20^{\circ}\text{C}$.

Для приготовления кисломолочного масла, сливки сквашивают с помощью *Str.lactis*, *Str citrovorus*, *Str.diacetilactis*.

Качество сливочного масла определяют по Сан Пин 2.3.4 551-96 «Производство молока и молочных продуктов» и Межгосударственному стандарту «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа» 1986-01-01. Ограничения срока действия снято Постановлением Госстандарта 28.12. №2330.:

- органолептически (вкус, привкус, цвет, запах);
- бактериологическим исследованием, когда делают глубинный посев 1 г готового продукта или его разведений в питательную среду МАФАНМ, чтобы через 48 часов культивирования определить микробное число (количество микроорганизмов в 1 г продукта), делают посев готового продукта или разведений в 5 мл среды Кесслер с целью обнаружения БГКП. Оценку санитарно-бактериологическому качеству масла дают по результатам, представленным в таблице 7.

Таблица 28 - Санитарно-бактериологические показатели сливочного масла

| Вид масла | Оценка | | | |
|--------------|------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | хорошая | | удовлетворительная | |
| | Е.coli нет, г | микробное число КОЕ/г | Е.coli нет, г | микробное число КОЕ/г |
| Вологодское | 1 | 1000 | 0,1 | 10000 |
| Любительское | 0,01 | 10000 | 0,001 | 100000 |
| Крестьянское | 0,01 | 10000 | 0,001 | 100000 |
| Бутербродное | 0,01 | 50000 | 0,001 | 500000 |

Таблица 29 - Показатели КМАФАнМ и БГКП в сливочном масле

| Вид масла | КМАФАнМ, КОЕ/г не более | БГКП в объеме, г | Жирность% |
|--------------|-------------------------------|---------------------|-----------|
| Вологодское | 1×10^4 | 0,1 | 82,5 |
| Любительское | 1×10^5 | 0,01 | 77 |
| Крестьянское | 1×10^5 | 0,01 | 72,5 |

В процессе хранения появляются изменения качества масла:

- вкус старого масла;
- прокисание (кислосливочное масло) от размножения молочнокислых бактерий;
- прогоркание от накопления маслянокислых клостридий;
- плесневение от размножения плесневых грибов *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium purpurogenum*, *Torula rosea* и др.

Микрофлора сыров, санитарно-бактериологическая оценка

Сыр – высокоценный пищевой продукт, содержит белки, соли, молочный жир, витамины. Для приготовления сыров используют молоко 1 класса, хорошего качества по сычужно-бродильной пробе, не содержащее спор мезофильных лактосбраживающих бацилл в $0,1 \text{ см}^3$.

Сыры подразделяют:

- кисломолочные;
- сычужные, большинство выпускаемых сыров сычужные, они бывают твердые и мягкие.

Для приготовления твердых и мягких сычужных сыров используют закваску: *Str.lactis*, *Str paracitrovorus*, *Str.diacetilactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacterium plantarum*, *L.casei*, *L.lactis*. При выработке твердых сыров закваска составляет 0,2 – 0,5%, мягких 3 – 5%. Для приготовления самых качественных сыров швейцарского и советского используют пропионовокислых бактерий.

Санитарно-бактериологический контроль по Сан Пин 2.3.4 551-96 «Производство молока и молочных продуктов» и Межгосударственному стандарту «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа» 1986-01-01. Ограничения срока действия снято Постановлением Госстандарта 28.12. №2330. сыр проходит после

прессования и в стадии готового продукта. Оценку качества дают после посева разных разведений сыра в среду Кесслер по результатам, представленным в таблице 9.

Таблица 30 – Оценка качества сыра по санитарно-бактериологическим показателям

| Сыр, этапы приготовления | Ед. измерения | Оценка результатов, отсутствие БГКП | | |
|--------------------------|---------------|-------------------------------------|--------|-------------------|
| | | отлично | хорошо | удовлетворительно |
| После прессования | г | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 |
| Зрелый | г | 0,1 | 0,01 | 0,001 |

При приготовлении и хранении могут проявиться пороки микробного происхождения:

- сыр без глазков (советский, швейцарский) от недостатка или гибели пропионовокислых бактерий;
- сыр со множеством глубоких глазков от недостатка молочнокислых бактерий;
- вспучивание от проникновения кишечной палочки; маслянокислых клостридий, *Vac polymyxa*;
- горький вкус от содержания избытка молочнокислых бактерий, маслянокислых клостридий;
- плесневение от размножения на поверхности осповидной плесни, а в пустотах грибов пенициллиумов.

ТЕМА 28

Санитарно-бактериологическая оценка мясopодуKтов, яиц (самостоятельная работа)

Цель занятия. Познакомиться с методами бактериологического анализа мяса, мясopодуKтов, яиц, выполнить отдельные этапы исследований.

Оборудование и материалы. Образцы мяса для бактериоскопии, посевы желтков на ПБ с маннитом, среду Эндо, Клигера, Симмонс агар, диагностические сальмонеллезные сыворотки, посевы экстракта колбасы на среду Кесслер, Эндо, ПА. Посевы сметаны, йогурта на среду Кесслер.

Задание для самостоятельной работы студентов.

1. Провести учет посевов сметаны, йогурта на среду Кесслер, дать заключение. 2. Провести бактериоскопия мазков-отпечатков мяса. 3. Учесть результаты посевов экстракта колбасы, желтков на среды для выделения и идентификации сальмонелл.

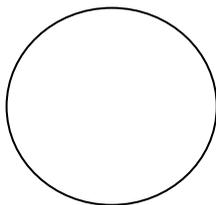


Рис. 36

Санитарно-бактериологическое исследование мяса

Мясо свиней, мелкого и крупного рогатого скота подлежит исследованию на свежесть. Для этого берут пробы до 200 г на уровне 4-5 шейных позвонков, в области лопатки, бедра.

Свежесть определяют:

- бактериоскопией мазков-отпечатков, в поле зрения около 10 микроорганизмов, при отсутствие признаков распада мышечных волокон;
- по содержанию летучих жирных кислот, мг;
- по состоянию бульона после добавления сернокислой меди (прозрачный, помутневший с хлопьями, образование желеобразного осадка).

В мясе птиц исключают сальмонеллы, бактериологическое исследование проводят по Национальному стандарту РФ «Продукты из мяса птицы» и ГОСТ Р 55499 - 2013. «Методы бактериологического исследования»

Для исследования берут 6 тушек из партии, с каждой тушки делают смыв и из трех мест каждой тушки берут пробы мяса по 20 г. Кусочки мяса измельчают, заливают стерильным физраствором.

Бактериологическое исследование проводят по схеме:

- посев проб на среду обогащения, через 16-20 часов посев на селенитовый бульон в соотношении 1:5, культивирование 24 часа;
- посев выращенной культуры на среду Эндо в чашках Петри, культивирование 18-24 часа;
- бесцветные колонии, выросшие на среде Эндо отсеивают на среды (Клигера, Симмонса, Гиса с маннитом, ПБ с индикаторными бумажками на индол) для идентификации сальмонелл, культивирование 18-24 часа;
- ставят капельную РА с комплексными и монорецепторными сальмонеллезными сыворотками для определения сероварианта сальмонелл.

Санитарно-бактериологическое исследование колбасных изделий и консервов

Колбасные изделия, копчености подлежат бактериологическому исследованию, для этого берут две пробы (от батона отрезают два кусочка длиной 10-15 см каждый), исследуют в течение 4 часов с момента отбора. Проводят:

- бактериоскопию мазков-отпечатков, микробов в поле зрения не должно быть;
- бактериологическое исследование, для этого 20 г образца измельчают в гомогенизаторе, разводят 80 мл стерильного физраствора, встряхивают, 1 мл сеют на 10 мл среды Кесслер с последующим пересевом на среду Эндо, чтобы исключить БГКП и сальмонеллы;

- индикацию и идентификацию сальмонелл посевом 25 мл экстракта на ПБ с 5% маннита в соотношении 1:5 и далее по схеме выделения и идентификации сальмонелл;
- индикацию протеев посевом 0,5 мл экстракта в конденсат косяка ПА.

В колбасах, копченостях не должно содержаться БГКП, сальмонелл, протеев.

Бактериологическое исследование консервов по ГОСТ 32125-2013 проводят если:

- подлежат закладке на длительное хранение;
- в мясе-сырье обнаружено повышенное содержание микроорганизмов;
- предназначены на экспорт.

Материалом для бактериологического исследования служат 50 банок из партии, которые термостатируют при 37⁰ С в течение 10 суток, если бомбаж не выявлен, из 3 банок делают посев по 0,5 мл содержимого на 2 пробирки с МПБ и на 2 пробирки с кластридиальным бульоном, посевы выдерживают в термостате в течение 5 суток.

В консервах не должно быть *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Proteus vulgaris*, *E.coli*. Допускается наличие *Bac.subtilis*, но тогда отправляют в реализацию.

Санитарно-бактериологическое исследование пищевых яиц

От здоровых кур получают стерильное яйцо, только на скорлупе находится микрофлора, которая попадает с подстилки гнезда, помета, тары, рук. В течение 5 суток содержимое яиц остается стерильным за счет бактерицидной активности лизоцима. При дальнейшем хранении микрофлора попадает внутрь яиц, вызывает порчу.

Известны такие виды порчи:

- гниение - от проникновения гнилостных бацилл;
- зеленая гниль – от размножения псевдомонад;

- красная гниль от размножения серратий;
- черная гниль – от размножения протеев;
- плесневение – от протикновение грибов аспергилл, пенициллиумов, а также актиномицетов.

Устанавливают порчу овоскопированием, яйца с признаками порчи в реализацию не допускаются.

Куры, больные туберкулезом, тифом, несут инфицированные яйца. Куры, имеющие транзитное носительство хозяин - неадаптированных сальмонелл, также содержат в яйце сальмонелл, вызывающих у человека токсикоинфекцию и сальмонеллез.

Пищевое яйцо подлежит бактериологическому исследованию с целью исключения сальмонелл. Для исследования отбирают 5 штук яиц из шести разных мест обследуемой партии, в первую очередь берут яйца, хранившиеся более 7 дней.

Вначале делают смывы: одним тампоном смывают 10 яиц, потом берут желтки (5 желтков для одной пробы).

Бактериологическое исследование проводят по схеме:

- посев проб на среду обогащения, через 16-20 часов посев на селенитовый бульон в соотношении 1:5, культивирование 24 часа;
- посев выращенной культуры на среду Эндо в чашках Петри, культивирование 18-24 часа;
- бесцветные колонии, выросшие на среде Эндо отсевают на среды (Клигера, Симмонса, Гиса с маннитом, ПБ с индикаторными бумажками на индол) для идентификации сальмонелл, культивирование 18-24 часа;
- ставят капельную РА с комплексными и монорецепторными сальмонеллезными сыворотками для определения сероварианта сальмонелл.

Пищевое яйцо не должно содержать сальмонелл.

*Экзаменационные вопросы по ветеринарной
микробиологии и микологии*

1. Систематика микробов.
2. Характеристика палочковидных.
3. Разновидности кокков.
4. Характеристика извитых.
5. Характеристика грибов, микозов.
6. Характеристика риккетсий и хламидий.
7. Характеристика микоплазм, L – форм бактерий.
8. Характеристика актиномицетов.
9. Способы размножения микробов.
10. Механизм питания. Химический состав бактериальной клетки.
11. Типы питания микроорганизмов.
12. Токсины микроорганизмов.
13. Типы дыхания микроорганизмов.
14. Структура бактериальной клетки.
15. Классификация питательных сред.
16. Культивирование микроорганизмов.
17. Фазы роста бактериальной популяции.
18. Сущность спиртового и молочнокислого брожения.
19. Характеристика пропионовокислого, маслянокислого и ацетоно-бутилового брожений.
20. Мутации микроорганизмов.
21. Рекомбинации бактерий.
22. Методы стерилизации.
23. Характеристика дезинфицирующих и антисептических препаратов.
24. Характеристика химиотерапевтических препаратов.
25. Антибиотики, классификация.
26. Продуценты и применение антибиотиков.
27. Кормовые антибиотики.
28. Характеристика бактериофагов.

29. Микрофлора почвы, санитарная оценка.
30. Аммонификация, сущность, значение.
31. Нитрификация и денитрификация.
32. Фиксация азота микробами.
33. Микрофлора кожи и дыхательных путей.
34. Микрофлора рубца.
35. Микрофлора кишечника.
36. Микрофлора мочеполовых органов, вымени.
37. Дисбактериоз, пробиотики, пребиотики, синбиотики, симбиотики.
38. Микрофлора воздуха, санитарная оценка.
39. Микрофлора воды, санитарная оценка.
40. Санитарно-бактериологическая оценка молочной посуды, оборудования.
41. Понятие об инфекции, инфекционном процессе, инфекционной болезни.
42. Формы инфекции.
43. Патогенность, вирулентность, факторы вирулентности.
44. Способы заражения, пути распространения возбудителя по организму.
45. Гуморальные показатели естественной резистентности.
46. Характеристика фагоцитоза.
47. Иммуитет, виды, категории.
48. Характеристика антигенов.
49. Характеристика антител.
50. Вспомогательные клетки иммунной системы.
51. Главные клетки иммунной системы.
52. Стадии иммунного ответа.
53. Естественная резистентность, иммунный статус, иммунодефицитное состояние.
54. Иммунологическая толерантность.
55. Аллергия, типы аллергических реакций, сущность.

56. Вакцины, характеристика.
57. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины.
58. Антигены и аллергены (препараты), разновидности, применение.
59. Реакция агглютинации и ее разновидности.
60. Реакция преципитации и ее разновидности.
61. Реакция связывания комплемента.
62. Возбудитель стафилококкозов.
63. Заболевания, вызываемые стрептококками, лабораторная диагностика, биопрепараты.
64. Возбудитель сибирской язвы.
65. Возбудители туберкулеза.
66. Возбудитель паратуберкулеза.
67. Возбудители бруцеллеза.
68. Возбудитель туляремии.
69. Возбудитель антропозоонозной чумы.
70. Возбудитель псевдотуберкулеза.
71. Характеристика синегнойной палочки.
72. Возбудитель сапа.
73. Возбудитель пастереллеза.
74. Возбудители гемофильного полисерозита, гемофильной плевропневмонии.
75. Возбудитель рожи свиней.
76. Возбудитель листериоза.
77. Возбудители сальмонеллезов.
78. Возбудитель эшерихиоза (колибактериоза).
79. Возбудитель эмкара.
80. Возбудитель столбняка.
81. Возбудитель ботулизма.
82. Возбудители злокачественного отека.
83. Возбудители браздота.
84. Заболевания, вызываемые *Cl.perfringens*.
85. Возбудитель некробактериоза.
86. Возбудитель копытной гнили.

87. Возбудитель Ку-лихорадки.
88. Возбудители хламидиозов.
89. Возбудители микоплазмозов.
90. Возбудители лептоспироза.
91. Возбудители кампилобактериоза.
92. Возбудитель анаэробной дезинтерии свиней.
93. Возбудители трихофитии.
94. Возбудители микроспории.
95. Возбудители аспергиллеза.
96. Возбудители афлатоксикоза.
97. Возбудители охратоксикоза.
98. Возбудители фузариотоксикозов.
99. Возбудитель стахиботриотоксикоза.
100. Санитарно-микробиологическая оценка комбикорма, мясокостной и рыбной муки.
101. Эпифитная микрофлора растений, микологическая оценка сена.
102. Эпифитная микрофлора зерна, микологическая оценка.
103. Микрофлора молока, санитарно-бактериологическая оценка.
104. Микрофлора кисломолочных продуктов, санитарно-бактериологическая оценка.
105. Микрофлора сливочного масла, сыров, санитарно-бактериологическая оценка.
106. Микрофлора мяса, Санитарно-бактериологическая оценка мяса, колбасных изделий, консервов.
107. Микрофлора яиц, санитарно-бактериологическая оценка.
108. Микробиология силосования. Санитарно-микробиологическая оценка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология: учебно-методическое пособие. Брянск: БГСХА, 2000. 68 с.
2. Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология и иммунология : тетрадь для лабораторных занятий заочного обучения: учебно-методическое пособие. Брянск: БГСХА. 2009. 44 с.
3. Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология и микология: тетрадь для лабораторных занятий: учебно-методическое пособие. Брянск: БГСХА, 2014. 49 с.
4. Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология и микология: учебно-методическое пособие для студентов заочного обучения. Брянск: БГСХА, 2016. 38 с.
5. Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством. ГОСТ 2874.82с.
6. Гигиенические требования безопасности окружающей среды. Санитарно-эпидемиологические требования и нормативы. СанПиН 2.3.2.1078-01-М.: ФГУП Интер СЭН, 2002. 168 с.
7. Емцев В.Т. Микробиология: учеб. для вузов. М.: Дрофа, 2008. 444 с.
8. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: практикум. СПб. – Москва Краснодар: Лань. 2012. 363 с.
9. Колычев Н.М. Руководство по микробиологии и иммунологии. Новосибирск: Арта, 2010. 256 с.
10. Колычев Н.М., Гозманов Р.Г. Ветеринарная микробиологии и микология. Электрон. дан. СПб.: Лань, 2014. 632 с.
11. Межгосударственный стандарт. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа 1986-01-01. Ограничения срока действия сняты Госстандартом 28.12.91 №2330. 86 с.

12. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. МУК 4.2.1890 – 04. 70 с.

13. Микробиоценоз кишечника в норме и патологии у молодняка птиц, крупного рогатого скота и целесообразность пробиотической и пребиотической коррекции: учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности «Ветеринария». Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2005. 79 с.

13. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2005. 768 с.

14. Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Барсков А.А. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии [электронный ресурс]: учебное пособие. Электрон. дан. СПб.: Лань, 2014. 397 с.

15. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды: методические указания. МУК 4.2.1018 – 01. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2001. 42 с.

16. Схема организации микробиологического контроля молочных производств. Сан ПиН 2.3.4551.96. 446 с.

17. Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Спирихин Т.В. Современные методы в ветеринарной микробиологии: учебное пособие для вузов. М.: КолосС, 2011. 109 с.

Учебное издание

Г.Ф. Бовкун

Ветеринарная микробиология и микология

Учебно-методическое пособие с использованием
элементов учебно-исследовательской работы
для студентов по специальности 36.05.01 Ветеринария

Редактор Осипова Е.Н.

Подписано к печати 11.03.2019 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага печатная. Усл. п. л. 11,51. Тираж 200 экз. Изд. № 6335

Издательство Брянского государственного аграрного
университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино,
Брянский ГАУ