

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВПО «Брянская государственная
сельскохозяйственная академия»

Г.Ф. Бовкун

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ

тетрадь для лабораторных занятий
(учебно-методическое пособие с использованием элементов
учебно-исследовательской работы)

для студентов по специальности 111801 - «Ветеринария»

Брянск 2014

УДК – 619:579
ББК – 52.6
Б 13

Бовкун Г.Ф. **Ветеринарная микробиология и микология:** тетрадь для лабораторных занятий (учебно-методическое пособие с использованием элементов учебно-исследовательской работы) / Г.Ф. Бовкун. - Брянск. Издательство Брянской ГСХА, 2014. – 49 с.

«Ветеринарная микробиология и микология» Тетрадь для лабораторных занятий (учебно-методическое пособие с использованием элементов учебно-исследовательской работы) составлена на основе требований ФГОС ВПО по направлению подготовки 111801 – «Ветеринария». Содержит современные теоретические данные по разделам систематики, морфологии, физиологии, экологии микроорганизмов, а также методики бактериоскопических, бактериологических, серологических исследований.

Рецензент: Заслуженный деятель науки РФ, доктор ветеринарных наук, профессор ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» *Борис Филиппович Бессарабов*

© Брянская ГСХА, 2014
© Г.Ф. Бовкун, 2014

ЗАНЯТИЕ №1

ТЕМА. *Правила работы в бактериологической лаборатории. Приготовление мазков. Характеристика палочковидных и извитых форм бактерий*

Содержание занятия:

1. Разобрать правила работы в бактериологической лаборатории, познакомиться с оборудованием рабочего места.
2. Освоить правила работы на монокулярном микроскопе Минимед-501.
3. Разобрать характеристику палочковидных бактерий и извитых.

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, окрашенных 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 краситель, 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 называют бактериями от латинского bacterium – палочка.

Большинство бактерий располагается по одиночке, если парами, называют *диплобактериям*, 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. когупе, 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 (диплобацилл), цепочками (стрептобациллы). Среди бацилл есть возбудители, полезные, много условно патогенных.

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

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 *кристистира* (*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.

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 anserina* – боррелиоза птиц, *Borrelia hyodysenteriae* – анаэробной дизентерии поросят.

Лептоспиры – 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 *Spirillaceae* относят род *Campylobacter*. Выделено и описано 15 видов и 15 подвидов *кампилобактерий* (греч. *kampylos* – изогнутый) - полиморфных изогнутых палочек в виде запятой или летящей чайки. Среди видов сапрофиты и возбудители: *Campylobacter fetus venerslis* (подвид)-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 представителей этого рода много сапрофитов.

Задание для самостоятельной работы:

1. Провести бактериоскопию взвесей *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, результат зарисовать.

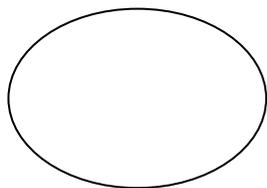


Рис.1

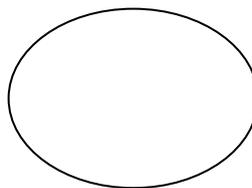


Рис.2

Контрольные вопросы

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

ЗАНЯТИЕ №2

ТЕМА. Морфология кокков

Содержание занятия:

1. Разобрать морфологию и систематику 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: *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Peptococcaceae* 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*;

Стрептококки составляют род *Streptococcus* семейства Streptococcaceae, 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				
	<i>Str.pyogenes</i>	<i>Str. agalactia</i>	<i>Str. pneumonia</i>	<i>Str.equi</i>	<i>Str.faecalis</i>
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, относят к семейству Micrococaceae 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.

Задание для самостоятельной работы:

1. Провести бактериоскопию взвеси *Streptococcus agalactia* и *Sarcina flava*, результат зарисовать.
2. Обнаружить микроскопией *Streptococcus pneumonia* и *St. aureus*, результат зарисовать.

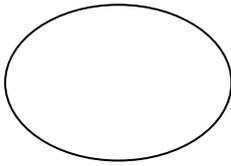


Рис.3

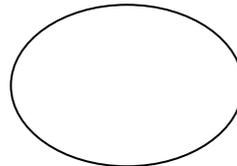


Рис.4

Контрольные вопросы

1. Характеристика кокков.
2. Характеристика грибов.

ЗАНЯТИЕ №3

ТЕМА. *Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов, грибов*

Содержание занятия:

1. Разобрать характеристику риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов, грибов.
2. Познакомиться со структурами грибов.

Характеристика риккетсий

Риккетсии – мелкие, полиморфные палочки, внутриклеточные паразиты, названы в честь американского ученого Х. Риккеса, 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 burnetii* – возбудитель Ку-лихорадки (Ку-риккетсиоза) крупного, мелкого рогатого скота, человека. Коксиеллы в отличие от других риккетсий могут длительно находиться в окружающей среде, устойчивы к высушиванию 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 Chlamydothila.

К роду Chlamidia относят:

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

К роду Chlamydothila относят:

- C.pneumonia- 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, лишённые 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 отряду 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
Название заболевания, клинические признаки	Перипневмония крупного рогатого скота (ПВЛ), экссудативная плевропневмония	Агалактия коз (мертвоорожденные, септицемия, мастит, у козлят септицемия, синовиит, артрит)	Респираторный микоплазмоз у молодняка индеек, кур (фибринозный аэросаккулит)

В патологии человека *M. pneumoniae* вызывает атипичную пневмонию, *M. hominis*, *M. urealyticum* – урогенитальный 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 aerofaciens* – хлортетрациклина; *Actinomyces rimosus* – окситетрациклина; *Actinomyces venezuelae* – хлорамфеникола.

Среди актиномицетов есть один возбудитель *Actinomyces bovis*, вызывает актиномикоз крупного рогатого скота с поражением 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Провести бактериоскопию взвесей риккетсий, бифидобактерий, хлебных дрожжей.

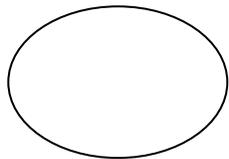


Рис. 5

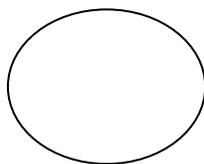


Рис.6

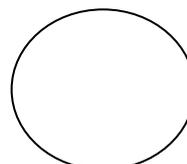


Рис.7

Контрольные вопросы

1. Характеристика риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов.

ЗАНЯТИЕ №4

ТЕМА. Структура бактериальной клетки. Сложные методы окрашивания

Содержание занятия:

1. Разобрать структуру бактериальной клетки и сложные методы окрашивания.

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 разделения, 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 бескапсульные.

▪ **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 биполярно.

▪ **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.

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.

Задание для самостоятельной работы

1. Провести бактериоскопию смеси бактерий по Граму, результат зарисовать.

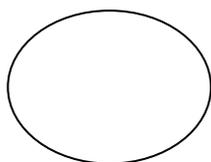


Рис.8.

Контрольные вопросы

Подготовиться к программированному контролю по разделу «систематика, морфология, структура микроорганизмов»

ЗАНЯТИЕ №5

ТЕМА. *Питательные среды. Культивирование бактерий. Выделение чистых культур аэробов, работа первого дня*

Содержание занятия:

1. Разобрать требования, предъявляемые к питательным средам и классификацию питательных сред.
2. Разобрать условия для выращивания бактерий.

3. Разобрать методику бактериологического исследования.

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), дефибрированной 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 CO₂ ;
- 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 Клигера 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 37⁰, для лептоспир 28-30⁰, грибов 26-28⁰;
- оптимальный рН, 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 культивирование 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 микробиологических исследований - бактериологического исследе-

дования.

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.

Задание для самостоятельной работы

1. Познакомиться с образцами питательных сред, концентратов.

2. Освоить методику приготовления питательных сред из концентратов, расфасовки в стерильные чашки Петри.

2. Выполнить работу первого дня по выделению чистых культур аэробов.

Контрольные вопросы

1. Питательные среды.

2. Культивирование микроорганизмов.

3. Типы питания бактерий.

4. Классификация токсинов микроорганизмов.

5. Типы дыхания микроорганизмов.

ЗАНЯТИЕ №6

ТЕМА. *Культуральные свойства микроорганизмов. Фазы роста микроорганизмов.*

Работа второго дня по выделению чистых культур аэробов

Содержание занятия:

1. Познакомиться с методикой изучения культуральных свойств микроорганизмов

2. Разобрать фазы роста микроорганизмов.

3. Выполнить работу второго дня по выделению чистых культур аэробов.

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 ко-

лонии.

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 Овальн Листовид	Гладкая Складчат	Плоский Выпукл. Вдавлен	Влажная Слизистая Сухая	Плотная Зернистая Ветвистая	Прозрач Полуп- Розрач Не про- зрач.	Есть Нет	Нет Есть	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 равнодействием 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Выполнить работу второго дня по выделению чистых культур аэробов.
2. Представить характеристику выделенным колониям, результат бактериоскопии зарисовать.

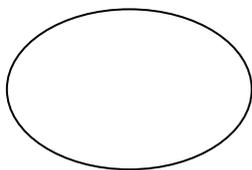


Рис. 8

Контрольные вопросы

1. Культуральные свойства микроорганизмов.
2. Фазы роста микроорганизмов.
3. Мутации у бактерий.
4. Рекомбинации бактерий.

ЗАНЯТИЕ №7

ТЕМА. Работа третьего дня по выделению чистых культур аэробов.
Методы идентификации. Этапы выделения чистых культур анаэробов

Содержание занятия:

1. Провести учет результатов по выделению чистых культур аэробов.
2. Разобрать методы идентификации.
3. Разобрать этапы выделения чистых культур анаэробов.

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 посевы 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 «Vitec»;
- *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 ге-

молиза:

- 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 D_{lm} (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 микроорганизмов с помощью ПЦР, для идентификации с помощью ПЦР можно использовать не только чистые культуры, но и субстраты обитания микроорганизмов, содержащие разные виды микробов.

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 анаэроостат, 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 кlostридиальный бульон (RCM), то после посева добавляют стерильное парафиновое масло и пастеризуют 30 мин при 75⁰ С на водяной бане. Инкубируют посевы не менее 7 дней при 30⁰ . Если обнаруживают черное окрашивание, проводят идентификацию.

Задание для самостоятельной работы

1. Провести работу третьего дня по выделению чистых культур аэробов.
2. Учесть результаты идентификации выделенных культур.
3. Выполнить отдельные этапы работы по выделению чистых культур анаэробов.

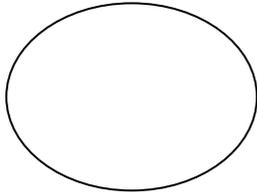


Рис. 9.

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.

ЗАНЯТИЕ №8

ТЕМА. Методы стерилизации. Химические противомикробные препараты

Содержание занятия:

1. Коллоквиум по разделу «Морфология и физиология микроорганизмов».
2. Разобрать методы стерилизации.
3. Разобрать химические противомикробные препараты.

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;
- *текучим 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;
- *тиндализация* – 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;

- фильтрацией 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, коррозионно-стойких материалов. Применяют газы и растворы. Для газовой стерилизации применяют:

- окись этилена в дозе 1200мг/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 2000мг/дм^3 , 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, со-

держат 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 ХБ*, 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* (двухтретьюосновная 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°С 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 крезола в калийном мыле) в виде 2%-ного раствора.

К поверхностно-активным 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 макроорганизма. Основателем химиотерапии является немецкий ученый П. Эрлих, синтезировавший в 1910 году первый химиотерапевтический препарат сольварсан, содержащий соединения мышьяка.

Первыми химиотерапевтическими средствами были сульфаниламидные препараты,

производные сульфаниловой кислоты. Впервые синтезированы Г. 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, цiproфлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, налидиксовая кислота).

Задание для самостоятельной работы

1. Познакомиться с оборудованием для стерилизации.
2. Распределить в таблице препараты по группам назначения.

Таблица 4 - Распределение препаратов по группам назначения

Название препарата	Дезинфектант	Антисептики	Химиотерапевтические		
			Сульфанилам	Нитрофуур.	Хинолон
Хлорная известь					
Фуразолидон					
H ₂ O ₂					
Формалин					
Лизол					
ДП-2					
Энрофлоксацин					
Офлоксацин					
Фурациллин					
Нифуроксазид					
Бисептол					
Биопаг					
Фенол					
Хлорамин					
Стрептоцид					
Норфлоксацин					
Надуксусная кислота					

Контрольные вопросы

1. Типы взаимоотношений в микромире.
2. Характеристика и классификация антибиотиков.

ЗАНЯТИЕ №9

ТЕМА: Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и бактериофагам

Содержание занятия:

1. Разобрать методы чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
2. Познакомиться с образцами антибиотиков разных групп.
3. Разобрать методы чувствительности микроорганизмов к бактериофагам.

4. Познакомиться с образцами бактериофагов.

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 вверх дном на темную матовую поверхность и определяют диаметр зон задержки роста, используя миллиметровую бумагу. Результаты анализируют по таблице 5.

Таблица 5 - 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	-	≤1000
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
Канамицин	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
Левифлоксацин	5	≤12	13 - 16	≥17	≥8	4	≤2

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

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.

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. Положительный 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 Апельмана*, 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 Грация*, 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить метод ДДМ для определения чувствительности микроорганизмов к АБП.
2. Провести учет чувствительности микроорганизмов к антибиотикам по методу ДДМ и по методу серийных разведений.

3. Познакомиться с образцами антибиотиков и распределить их по группам в таблице 6.
4. Познакомиться с методами определения чувствительности микроорганизмов к фагам, учесть результаты демонстрационных опытов.
5. Познакомиться с образцами фагов.
4. Познакомиться с методами определения чувствительности микроорганизмов к фагам, учесть результаты демонстрационных опытов.
5. Познакомиться с образцами фагов.

Таблица 6 - 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	
Плевромугилины	

Контрольные вопросы

1. Продуценты антибиотиков.
2. Применение антибиотиков и характеристика кормовых антибиотиков.
3. Характеристика фагов.

ЗАНЯТИЕ №10

ТЕМА. Санитарно-гигиеническая оценка почвы. Круговорот азота и углерода

Содержание занятия:

1. Провести учет результатов чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
2. Разобрать методику санитарно-бактериологического исследования почвы.
3. Разобрать механизм круговорота азота и углерода.

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 эпидемиологическим 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 7.

Таблица 7 - 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 посеvy на среду Эндо, отсевают бесцветные колонии, идентифицируют выделенную культуру по биохимическим, протеолитическим и антигенным свойствам.

Способность почвы к самоочищению обусловлена:

- деятельностью гнилостных бацилл 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 ядови-

тый 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, бескормицей) 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 мочевого 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 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

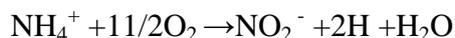
Уробактерии могут размножаться при pH 9-10, к ним относят *Micrococcus ureae*, *Sporosarcina ureae*, в анаэробных условиях расщепляет мочевины *Bac.pasteurii*.

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.

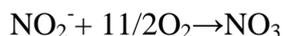
Процесс окисления аммиака до нитритов и нитратов называют *нитрификацией*.

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 аутоотрофы, 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.

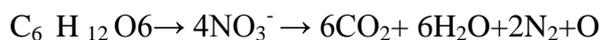
Усиленная нитрификация приводит к закислению почв. В природе существуют обратный процесс.

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.



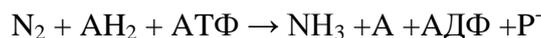
Процесс денитрификации сдерживает закисление почв, что полезно.

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

- свободноживущих: *Asotobacter chroococcum*, бактерии из группы *Weiserinckia* в честь первооткрывателя Бейринка в 1901 г, он выделил *Asotobacter chroococcum*, *CL.pasteurianum*, выделен Виноградским 1893г. *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 -бактероидные формы, активно восстанавливающие азот и выделяющие в сосудистую систему растений аммиак, который взаимодействует с оксикислотами с образованием аминокислот.

Азотификсаторы интенсивно обогащают почву азотистыми соединениями, входят в состав микробных земледобрильных препаратов.

Микробные земледобрильные 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 *Vac.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

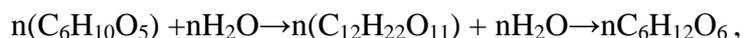


Глюкоза преобразуется до спиртов, органических кислот, а затем распадается до CH_4 (метана).

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

Большое количество клетчатки находится в поверхностных, хорошо аэрируемых слоях почвы, где ее расщепляют микробы из родов: *Cytophaga*; *Cellulomonas*; *Мухососсасеае*; 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 *Cytophaga* были открыты в 1918 г Хутчинсом, Клейтоном.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить методику санитарно-бактериологического исследования почвы, провести учет результатов.
2. Познакомиться с образцами земледобрильных препаратов

Контрольные вопросы

1. Санитарно-бактериологическая оценка почвы.
2. Аммонификация, сущность.
3. Нитрификация и денитрификация.
4. Фиксация азота.
4. Аэробное и анаэробное расщепление клетчатки.

ЗАНЯТИЕ №11

ТЕМА. *Микрофлора воды и воздуха, санитарно-бактериологическая оценка*

Содержание занятия:

1. Программированный контроль по теме: «Круговорот азота и углерода».
2. Разобрать методику исследования и учета санитарно-бактериологической оценки воды.
3. Разобрать методику исследования и учета санитарно-бактериологической оценки

воздуха.

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 питьевая. 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 МАФАнМ 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 8.

Таблица 8 - 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 9.

Таблица 9 - Коли-индекс БГКП при исследовании 300 мл воды

Количество положительных результатов			Коли-индекс
Из трех флаконов по 100мл	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
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 аэрозольном 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 безопас-

ности окружающей среды. Санитарно-эпидемиологические требования и нормативы. Сан-Пин 2.3.21078-01, определяя *микробное число*- количество микроорганизмов в 1м³ 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 Оме-лянского:

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

- a- количество выросших колоний;
- v- площадь чашки Петри 78,5 см² ;
- t – время посева.

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

$Микробное\ число = (a \cdot 1000) : V$, 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 1м³. Санитарная оценка воздуха закрытых жилых и производственных помещений представлена в табл. 10.

Таблица 10 - Санитарная оценка воздуха закрытых помещений

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

Допустимые показатели микробного числа воздуха в животноводческих помещениях представлены в табл. 11.

Таблица 11 - Микробное число воздуха животноводческих помещений

Предназначение помещения	Микробное число в 1м 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
Тепляк для окота овец	50000
Конюшня	50000

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

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить методику определения микробного числа, коли-индекса воды и расчета коли-индекса и коли-титра.

2. Освоить методы оседания и аспирационный посева воздуха.

Контрольные вопросы

1. Микрофлора рубца.
2. Микрофлора кишечника.
3. Дисбактериоз, характеристика форм.
4. Пробиотики, пребиотики, синбиотики, симбиотики.

ЗАНЯТИЕ №12

ТЕМА: Санитарно-бактериологическая оценка молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений. Микрофлора тел животных

Содержание занятия:

1. Провести учет результатов титрационного метода определения коли-индекса водопроводной воды.
2. Рассчитать коли-титр водопроводной воды.
3. Рассчитать микробное число воздуха лаборатории и других помещений, дать санитарную оценку помещений.
4. Разобрать метод санитарно-бактериологической оценки молочной посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений.
5. Разобрать микрофлору кожи, органов дыхания, вымени.

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 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 табл. 12.

Таблица 12 - Оценка 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 протираем 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 наличие 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 100см², 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, см². Результат выражают числом КОЕ на 1 см² исследуемой поверхности. Нормативные показатели предметов окружающей среды по санитарно-микробиологическим тестам представлены в таблице 13.

Таблица 13 - 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 пробы, 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 грамотрицательных 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 пролиферируют, 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить методику учета титрационного метода определения коли-индекса воды, расчета колититра, санитарной оценки воздуха и помещений.
2. Освоить методику санитарной оценки посуды, доильных аппаратов, оборудования птицепомещений.

3. Сделать посев отпечатка пальца.

Контрольные вопросы

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

ЗАНЯТИЕ №13

ТЕМА: *Препараты специфической профилактики, терапии и диагностики инфекционных болезней*

Содержание занятия:

1. Разобрать методику учета определения коли-титра смывов.
2. Изучить характеристику вакцин, сывороточных препаратов.
3. Познакомиться с образцами и характеристикой диагностических препаратов.

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)- обзвуженные формалином экзотоксины возбудителей, сорбированные на адьювантах. Применяют для профилактики инфекционных заболеваний, в патогенезе которых важная роль принадлежит токсинам (ботулизм, столбняк, эмкар, бразот, злокачественный отек). Анатоксины выпускают в форме моно- (гидроокисьюалюминенвая формолвакцина против эмкара) и ассоциированных (вакцина против бразота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека и анаэробной дизентерии ягнят).

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

● *Поливалентными* называют вакцины против разных серогрупп или серовариантов возбудителей (поливалентная гидроокисьюалюминенвая 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. Формируется 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, воль, кроликов, которым вводят антигены по разработанной схеме, по окончанию цикла производят 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 воль. Лечебно-профилактические сыворотки применяют подкожно или внутримышечно в нескольких местах (лечебная доза 50-100 мл), чаще однократно. Осложнения: анафилактический шок, сы-

вороточная 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:

- внутрикожно (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).

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить методику учета коли-титра смывов молочной посуды, доильного оборудования.
2. Познакомиться с образцами биопрепаратов и их назначением.

Контрольные вопросы

1. Естественная резистентность и общезоофизиологические показатели.
2. Клеточные факторы естественной резистентности.
3. Гуморальные факторы естественной резистентности.
4. Вакцины.

ТЕМА: Реакция агглютинации и современные разновидности

Содержание занятия:

1. Разобрать сущность, методику постановки и учета РА.
2. Разобрать разновидности РА, методику постановки и учета 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 37⁰ С, 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 – 38⁰ С 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 пунтик;
- отрицательная – осадок пунтик.

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).

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить методику постановки и учета РБП.

2. Освоить методику постановки и учета пробирочной РА для выявления бруцеллезных Ig в сыворотке крови крупного рогатого скота.

3. Поставить и учесть РНГА для выявления сальмонеллезных антител в сыворотке крови овцематки.

Контрольные вопросы

1. Сущность, методика постановки, учета РА.

2. Современные разновидности РА.

3. Виды и категории иммунитета.

ЗАНЯТИЕ №15

ТЕМА: Разновидности реакции преципитации

Содержание занятия:

1. Разобрать сущность, технику постановки и учета разновидностей реакции 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 экс-

тракт 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 антитоксических сывороток. Разновидностью флокуляции 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 диффузионной 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить технику постановки и учета кольцепреципитации по Асколи.
2. Освоить технику постановки и учета РИД для диагностики бруцеллеза.
3. Познакомиться с методикой постановки и учета реакции флокуляции.

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.
35. Реакция агглютинации.
36. Современные разновидности РА.

ЗАНЯТИЕ № 16

ТЕМА. Реакция связывания комплемента (РСК)

Содержание занятия:

1. Разобрать сущность, методику постановки и учета РСК.

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. Компле-

мент 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 14 - 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 – 10⁰ С в течение 12 – 16 часов, то тогда ее называют РДСК (реакцией длительного связывания комплемента). 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 – 62⁰ С – 20 мин. Добавляют в первую пробирку антиген и комплемент по 0,2 мл, выдерживают при 37⁰ С – 20 мин. Затем в первую и во вторую пробирки вносят по 0,4 мл гемсистемы, выдерживают при 37⁰ С 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.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить технику постановки, учета РСК.

Контрольные вопросы

1. Разновидности реакции преципитации.

ТЕМА. Иммуноферментный анализ (ИФА)**Содержание занятия:**

1. Разобрать сущность, разновидности и методику постановки ИФА.

ИФА – высокочувствительный метод выявления комплекса антиген - антитело, меченого ферментом, по разложению субстрата и образованию окрашивания или изменению плотности раствора.

ИФА применяют для:

- обнаружения антигена (возбудителя) в исследуемом материале;
- антител у обследуемых (больных, переболевших, вакцинированных).

ИФА ставят в двух вариантах:

- *гистохимическом*, который называют иммунопероксидазной реакцией, ставят для выявления возбудителя в мазках, гистосрезках, культурах клеток, выращенных на предметных стеклах, используя прямой и непрямой метод, в положительных случаях образуется цветное окрашивание, обнаруживаемое микроскопией, используют редко ;

- *твердофазном* – в лунках микропанелей (серологических планшетов).

Твердофазный вариант ИФА (ТФИФА, РЭМА – реакция энзиммеченых антител, ELISA – enzyme –linked immunosorbent assay) широко применяют для диагностики бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний.

Для выявления антител лунки планшета сенсибилизируют инактивированным антигеном, а для выявления антигена (возбудителя) в исследуемом материале – антителами.

Ставят ИФА в три этапа.

- В первом этапе взаимодействуют антиген и антитело при 37⁰ С в течение 1 часа, с последующим 5-кратным промыванием промывочным буфером и осушением.

- Во втором этапе в лунки вносят *конъюгат* (антивидовой глобулин, меченный пероксидазой или щелочной фосфатазой), экспозиция взаимодействия 45 мин при 37⁰ С, с последующим 5-кратным промыванием и осушением.

- В третьем этапе добавляют *субстрат* – вещество, разлагающееся под действием фермента с образованием окрашивания или изменения плотности раствора. Экспозиция взаимодействия в течение 30 мин при 37⁰ С. К субстратам относят:

- ортофенилдиамин (ОФД);
- 5-аминосалициловую кислоту;
- тетраметилбензидин (ТМБ);
- нитрофенилфосфат (НФФ).

Ортофенилдиамин (ОФД), 5-аминосалициловую кислоту, тетраметилбензидин (ТМБ) применяют, чтобы выявить пероксидазу. Нитрофенилфосфат (НФФ) используют, чтобы выявить щелочную фосфатазу.

Если происходит образование комплекса антигена с антителом, он фиксируется к стенкам лунок и обязательно взаимодействует с конъюгатом (антивидовым глобулином, меченым ферментом), адсорбируя фермент. При добавлении субстрата происходит его разложение под действием фермента, которое проявляется:

- появлением окрашивания: желто-коричневого при разложении ОФД, 5-аминосалициловой кислоты, НФФ, голубого - при разложении ТМБ;
- повышается плотность раствора, устанавливают на спектрофотометре.

Появление окрашивания в лунках, увеличение плотности раствора характеризуется положительной реакцией.

Если комплекса антигена с антителом не образуется, конъюгат после контакта не фиксируется и смывается, окрашивания не образуется, изменения плотности раствора не проис-

ходит – отрицательная реакция.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить технику постановки, учета ИФА для выявления сальмонеллезных Ig в сыворотке уток.

Контрольные вопросы

1. ИФА сущность и техника постановки.
2. Органы и вспомогательные клетки иммунной системы.
3. Главные клетки иммунной системы.
4. Стадии иммунного ответа.

ЗАНЯТИЕ № 18

ТЕМА: *Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)*

Содержание занятия:

1. Разобрать сущность и методику постановки ПЦР.
2. Разобрать сущность и методику постановки РИФ.

Сущность и методика постановки полимеразной цепной реакции ПЦР

ПЦР – экспресс метод для индикации и идентификации возбудителя, разработан К. Мюллис в 1983 году. Достоинства ПЦР:

- быстрота анализа;
- высокая чувствительность и специфичность;
- минимальное количество исследуемого материала;
- простота исполнения и возможность полной автоматизации.

Основу метода составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определенных фрагментов молекулы ДНК *in vitro*.

ПЦР ставят в 25 – 40 циклов. Каждый цикл включает три этапа:

- *денатурация ДНК* при 95⁰ С в течение 5 мин, при этом две цепи ДНК расходятся – термическое разделение молекулы ДНК на отдельные цепочки;
- *отжиг или присоединение праймеров* – фрагментов ДНК, специфичных для возбудителя, используют синтетические праймеры или приготовленные, отжиг проводят при 50 – 65⁰ С – 30 сек;
- *элонгация или полимеризация*, когда вносят фермент ДНК-полимеразу при температуре 68 – 72⁰ С в течение 30 сек. В течение одного цикла происходит удвоение искомого генетического материала.

Для индикации возбудителя необходимо получить несколько миллионов фрагментов ДНК, что удается в течение 25 – 40 циклов. Идентификацию проводят электрофорезом с окрашиванием бромистым этидием.

Методика постановки ПЦР включает:

- *выделение ДНК-матрицы исследуемого материала;*
- *смешивание выделенной ДНК с амплификационной смесью:* ДНК-полимеразой, двумя видами праймеров, хлористым магнием, буфером, деионизированной водой и минеральным маслом;
- *амплификация в амплификаторе*, где происходит денатурация, отжиг, элонгация, по программе;
- *учет результатов электрофорезом в 1-2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия.*

того этидия, по образованию светящихся или серых полос.

Метод ПЦР применяют:

- для индикации и идентификации возбудителей;
- ДНК – идентификации личности человека, установления родства, выявления генов наследственных болезней.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) или метод флуоресцирующих антител (МФА)

Основу метода составляет явление люминесценции, сущность которого в поглощении световой энергии с последующим выделением его в виде светового излучения.

В РИФ люминесценция проявляется в виде флуоресценции – свечения, веществ – флуорохромов, сорбированных на клетках микроорганизмов, возникающее в момент облучения возбуждающим светом.

Для возбуждения флуоресценции используют ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра (длина волны 300-400 нм). Для этих целей выпускают люминесцентные микроскопы разных моделей: МЛ-1, МЛ-4, «Люам».

Метод РИФ заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом вступают в специфическую связь с гомологичным антигеном и образующийся комплекс обнаруживают по характерному свечению.

Методика постановки включает:

- *приготовление мазков* на предметных стеклах, можно использовать и гистосрезы;
- *подсушивание мазков при комнатной температуре и фиксация* охлажденным ацетоном при комнатной температуре или при минус 15⁰ С от 15 мин до 4 – 6 часов;
- *окрашивание по прямому или непрямому методу;*
- *учет в крестах по интенсивности свечения*

Интенсивность свечения оценивают:

- # - очень яркая флуоресценция по периферии клетки;
- +++ - яркая флуоресценция периферии клетки;
- ++ - слабое свечение периферии клетки;
- -- нет контрастного свечения.

Окрашивание прямым методом

На фиксированный мазок наносят флуоресцирующую специфическую сыворотку, выдерживают 30 мин во влажной камере при 37⁰ С. Отмывают физиологическим раствором, подсушивают и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

Флуоресцирующие специфические сыворотки еще называют конъюгатом. Для его приготовления используют высокоактивные гипериммунные сыворотки, меченные ФИТЦ-флуоресц изотиоцианатом (зеленое свечение) и РСХ – родомин сульфохлоридом (красное свечение).

Окрашивание непрямым методом

На фиксированный препарат наносят гипериммунную сыворотку, выдерживают 30 мин при 37⁰ С, отмывают и наносят антивидовую сыворотку, меченную флуорохромом, выдерживают 30 мин при 37⁰ С. Затем препарат отмывают, подсушивают и микроскопируют.

РИФ (МФА) – экспресс-метод идентификации некоторых возбудителей, характеризуется:

- высокой специфичностью и чувствительностью;
- простотой техники постановки;
- использованием минимального количества компонентов.

Задание для самостоятельной работы

1. Освоить технику постановки и учета РИФ.

Контрольные вопросы

1. Зачет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством. ГОСТ 2874-82.
2. Гигиенические требования безопасности окружающей среды. Санитарно-эпидемиологические требования и нормативы. Сан ПиН 2.3.2.1078-01-М.: ФГУП Интер СЭН, 2002.- 168с.
3. Емцев В.Т. Микробиология: учеб. для вузов/ В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. -7-е изд., стер.-М.: Дрофа, 2008. – 444 с.
4. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум.-СПБ – Москва- Краснодар: Лань, 2012.- 363 с.
5. Колычев Н.М. Руководство по микробиологии и иммунологии // Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко, Р.Г. Гозманов [и др] – Новосибирск: Арта, 2010.-256 с.
6. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890 – 04.- 70 с.
7. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского.- 3-е изд. – М.:ГЭОТАР – Медиа. 2005.-768 с.
8. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды: Методические указания. МУК 4.2.1018 – 01. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. – 42 с.
9. Современные методы в ветеринарной микробиологии: учебное пособие для вузов/ Л.Ф. Зыкин, З.Ю. Хапцев, Т.В. Спиряхин – М.: КолосС, 2011. – 109 с.

Учебное издание

Бовкун Галина Федоровна

**ВЕТЕРИНАРНАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ**

тетрадь для лабораторных занятий
(учебно-методическое пособие с использованием элементов
учебно-исследовательской работы)

для студентов по специальности 111801 - «Ветеринария»

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 31.01.2014 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага печатная. Усл. п. л. 2,84. Тираж 100 экз. Изд. № 2555.

Издательство Брянской государственной сельскохозяйственной академии.
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянская ГСХА