



УЧЕБНИК



**Т.С.КОСТЕНКО, В.Б.РОДИОНОВА,
Д.И.СКОРОДУМОВ**

**ПРАКТИКУМ
ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ
И ИММУНОЛОГИИ**

619: 579(040)
К82



УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ ДЛЯ СТУДЕНТОВ
ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ



Т. С. КОСТЕНКО, В. Б. РОДИОНОВА,
Д. И. СКОРОДУМОВ

ПРАКТИКУМ ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Допущено Министерством сельского хозяйства Рос-
сийской Федерации в качестве учебного пособия для
студентов высших учебных заведений по специальнос-
ти 310800 «Ветеринария»



МОСКВА «КОЛОС» 2001

УДК 616.9:619(076.5)
ББК 48.73я73
К72

Редактор В. В. Ракитская

Рецензент профессор П. Ф. Сонин (С.-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины)

Костенко Т. С., Родионова В. Б., Скородумов Д. И. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. — М.: Колос, 2001. — 344 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
ISBN 5—10—003507—2.

Изложены методы бактериологических и серологических исследований, приведены схемы лабораторной диагностики бактериозов и микозов сельскохозяйственных животных.

Каждая тема содержит методические указания, перечень материалов, необходимых для проведения занятия, задания для самостоятельной работы и контрольные вопросы для самопроверки.

Практикум может быть полезен при проведении факультативных занятий.

Для студентов вузов по специальности «Ветеринария».

УДК 616.9:619(076.5)
ББК 48.73я73

ISBN 5—10—003507—2

© Издательство «Колос», 2001

Раздел I

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема 1

ВЕТЕРИНАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Ознакомить студентов с назначением бактериологической лаборатории, ее основным оборудованием и правилами техники безопасности; с принципами фазово-контрастной, темнопольной, люминесцентной, электронной микроскопии. Освоить микроскопическое исследование бактериальных препаратов с применением иммерсионной системы. Изучить основные формы бактерий и методику определения их размеров.

Оборудование и материалы. Термостаты, микроаэроостаты, холодильники, сушильные шкафы, автоклавы, центрифуги, вакуумные насосы, дистиллятор, водяные бани, потенциометр (рН-метр), фильтры, лабораторная посуда, световой, люминесцентный и электронный микроскопы, темнопольный конденсор, фазово-контрастное устройство, окуляр- и объект-микрометры, готовые препараты с бактериями, иммерсионное масло.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Ветеринарно-бактериологическая лаборатория. Это учреждение Государственной ветеринарной службы РФ. Различают районные, межрайонные, областные (краевые) и республиканские лаборатории. В их задачи входят: проведение бактериологических, серологических, вирусологических, микологических, биохимических, патологоанатомических и других исследований для установления лабораторного диагноза болезней животных всех видов, проведение экспертизы молока, мяса и других пищевых продуктов и кормов.

Лаборатории размещают в специальном здании с дифференциацией на отделы. Например, для межрайонных и районных ветеринарных лабораторий предусмотрены бактериологический, серологический и химико-токсикологический отделы. Выделяют помещение для вивария, где содержат экспериментальных животных (мыши, морские свинки, кролики и т. д.), а также барана

как донора крови, необходимой для приготовления питательных сред и постановки серологических реакций (РСК). Зараженных и здоровых животных содержат в разных комнатах вивария.

В бактериологической лаборатории оборудуют боксы. Под них отводят отгороженную стеклянной переборкой часть помещения или две-три смежные комнаты. В боксе работают, когда необходимо предотвратить контаминацию (загрязнение) окружающей среды патогенными микроорганизмами или исследуемых культур посторонней микрофлорой. Перед работой воздух и стенки бокса обеззараживают ультрафиолетовыми лучами бактерицидных ламп.

В отдельных помещениях лабораторного корпуса моют посуду, инструменты (моечная), готовят питательные среды (бактериологическая кухня), стерилизуют посуду, среды, спецодежду, обеззараживают культуры бактерий и инфекционный материал (автоклавная).

Правила техники безопасности в ветеринарно-бактериологической лаборатории. Работа в бактериологических лабораториях сопряжена с опасностью заразиться самим или заразить других патогенными микроорганизмами. Для студентов ветеринарных вузов лабораторией служит кафедра микробиологии. Сотрудники бактериологических лабораторий и кафедры микробиологии, аспиранты, студенты, приходящие на занятия или для работы в научно-студенческих кружках, обязаны ознакомиться с правилами техники безопасности и строго их соблюдать.

Входить в помещение лаборатории и работать в ней разрешается только в специальной одежде — халате и головном уборе (шапочка, косынка). Халат должен быть застегнут, волосы подбраны.

Не разрешается вносить посторонние предметы; личные вещи (портфели, сумки) оставляют в отведенных для этой цели местах. Категорически запрещается курить и принимать пищу.

Перед началом работы проверяют исправность приборов (газовых и спиртовых горелок). О всех неисправностях сообщают ответственному лицу лаборатории, на учебных занятиях — преподавателю.

Не разрешается зажигать одну горелку от другой во избежание взрыва. Для зажигания горелок используют только спички.

Электроприборы включают с разрешения преподавателя или обслуживающего персонала кафедры. Запрещается касаться проводов и контактных частей электросети.

Рабочее место и оборудование содержат в чистоте, соблюдают опрятность в работе.

Исследуемый материал должен рассматриваться как особо опасный. При работе с ним необходимо соблюдать принятые в микробиологической практике технические правила, исключая возможность заражения работника.

Движение культур микроорганизмов (посев, хранение, уничтожение) регистрируют согласно действующей инструкции в специальном журнале.

В случае попадания материала или культур микроорганизмов на пол, стол и т. д. обрабатывают эти поверхности дезинфицирующим раствором.

После окончания работы использованный материал (патологический материал, бактериальные, грибные культуры, инструменты и др.) студенты отдают преподавателю или лаборанту для обеззараживания, рабочее место тщательно убирают и дезинфицируют; моют и дезинфицируют руки, халаты и головные уборы складывают в полиэтиленовые пакеты.

После ознакомления с правилами техники безопасности на кафедре микробиологии студенты расписываются в журнале преподавателя.

Основное оборудование диагностических бактериологических лабораторий. Лаборатории в обязательном порядке оснащены следующим оборудованием.

Термостат используют для культивирования микроорганизмов в аэробных условиях. Это шкаф с двойными стенками, пространство между которыми заполнено водой или воздухом; снабжен устройством для поддержания постоянной температуры в диапазоне 28...43 °С (стабильную температуру лучше поддерживают водяные термостаты).

Микроанаэроостаты необходимы для культивирования клеток в анаэробных условиях (см. тему 7); представляют собой герметические емкости, из которых с помощью насоса удаляют воздух и затем помещают в термостат.

Печь Пастера и автоклав служат для стерилизации инструментов, лабораторной посуды, питательных сред, спецодежды и т. д. Их устройство и принцип работы подробно изложены в теме 6.

Холодильники бытовые (4...6 °С) и низкотемпературные (-20 °С и ниже) используют для хранения питательных сред, культур микроорганизмов, вакцин, сывороток, поступившего для бактериологического исследования материала.

Центрифуги настольные, рефрижераторные (для разделения компонентов в условиях низких температур), микроцентрифуги предназначены для осаждения микроорганизмов, отделения форменных элементов от плазмы крови и др.

Помимо перечисленного оборудования в лаборатории необходимы: вакуумные насосы, дистиллятор, технические и аналитические весы, водяные бани, потенциометр, керамические, асбестовые и мембранные фильтры, аппараты для изготовления ватно-марлевых пробок, лабораторная посуда — чашки Петри, бактериологические и серологические пробирки, пластиковые планшеты для культуральных работ и микротитрования, колбы,

мерные цилиндры, матрацы, градуированные и пастеровские пипетки, специальные инструменты — бактериологические петли, иглы, шприцы, пинцеты, шпатели, ножницы и т. д.

Техника микрофотографии. Микроскопы, дающие увеличение в сотни (световой) или тысячи раз (электронный), используют для изучения морфологии и строения микроорганизмов. Бактериологические лаборатории снабжены микроскопами различных типов: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, «Биолам», Р-1 и др.

Световой микроскоп. Основные узлы световых микроскопов показаны на рисунке 1.

К механическим частям микроскопа относят штатив, состоящий из основания и тубусодержателя. К тубусодержателю 12 прикреплены: тубус 14, револьвер 18 — вращающийся диск с гнездами для объективов и предметный столик 20 с клеммами 5, фиксирующими предметное стекло с изучаемым объектом. Тубус передвигают вверх-вниз при помощи макро- 2 и микрометрического 1 винтов.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, зеркала, апертурной диафрагмы, конденсора, объективов и окуляров. Зеркало 23 подвижно закреплено под конденсором,

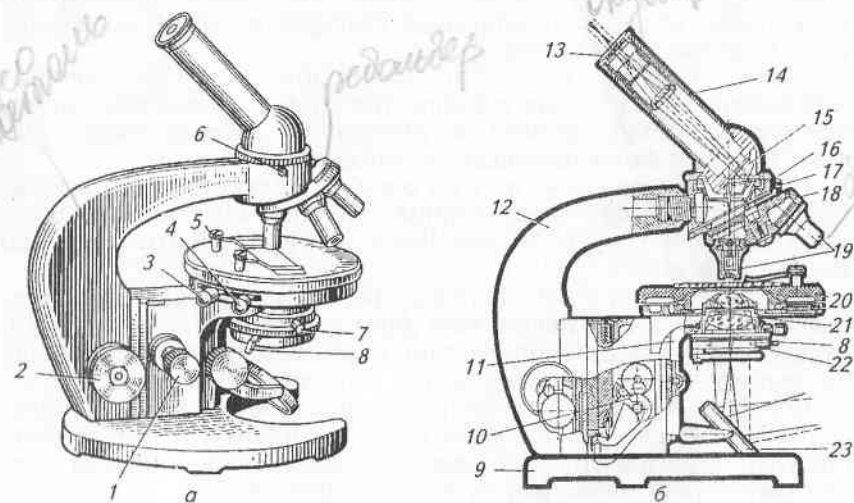


Рис. 1. Общий вид (а) и схема (б) микроскопа МБР-1:

1 — микрометрический винт; 2 — макрометрический винт; 3 — стопорный винт; 4 — центрировочный винт для установки препарата; 5 — пружинные клеммы; 6 — винт для укрепления тубуса; 7 — стопорный винт конденсора; 8 — рукоятка перемещения диафрагмы; 9 — башмак микроскопа; 10 — коробка с микромеханизмом; 11 — кронштейн конденсора; 12 — тубусодержатель; 13 — окуляр; 14 — наклонный тубус; 15 — призма; 16 — головка тубусодержателя; 17 — винт для фиксации револьвера; 18 — револьвер на салазках; 19 — объективы; 20 — предметный столик; 21 — конденсор; 22 — апертурная диафрагма; 23 — зеркало

одна его поверхность плоская, другая — вогнутая. При работе с конденсором используют плоскую, без конденсора — вогнутую поверхность зеркала. Конденсор 21 применяют для концентрирования отраженных зеркалом лучей света, фокус которых должен находиться в плоскости препарата. Верхняя линза конденсора плоско-выпуклая, нижняя — двояковыпуклая. Под конденсором помещена апертурная (ирисовая) диафрагма 22. Изменяя диаметр отверстия, через которое проходит пучок света, регулируют интенсивность освещения поля зрения.

Объективы 19 состоят из нескольких линз, заключенных в металлическую оправу. Только одна линза — фронтальная — выполняет функцию увеличения, остальные предназначены для коррекции изображения. Под рабочим расстоянием объектива понимают расстояние от плоскости фронтальной линзы до изучаемого объекта при нахождении последнего в фокусе. Чем больше увеличение объектива, тем меньше рабочее расстояние и поле зрения. На корпусе объектива обозначены его увеличивающая способность ($\times 8$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 90$) и числовая апертура.

Числовая апертура отражает количество света, попадающего в линзу:

$$A = n \sin u,$$

где A — числовая апертура линзы; n — показатель преломления среды, граничащей с линзой; u — половина ответственного угла α (рис. 2).

Окуляр 13 содержит глазную и собирающую линзы, которые увеличивают изображение, полученное при помощи объектива. На окулярах указано их увеличение ($\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$).

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличений окуляра и объектива: например, окуляр $\times 10$ и объектив $\times 90$ увеличивают объект в 900 раз. Важно получить не только увеличенное, но и четкое изображение исследуемого объекта. Четкость изображения зависит от разрешающей способности микроскопа, которую понимают как минимальное расстояние между двумя точками, при котором они видны отдельно.

Разрешающая способность микроскопа зависит от числовой апертуры и длины волны используемого света. Например, апертура объектива $\times 40$ составляет 0,65, конденсора — 1,0, ис-

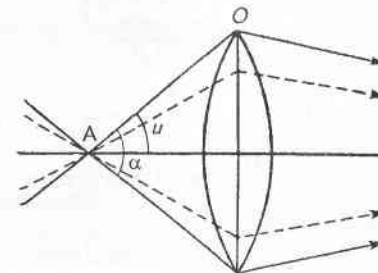


Рис. 2. Схема хода лучей при разном значении угла α :

A — объект; O — объектив; u — половина ответственного угла

пользован зеленый свет с длиной волны 0,55 мкм, отсюда разрешающую способность вычисляют по формуле

$$\alpha = \lambda / (A_1 + A_2),$$

где α — минимальное расстояние между двумя точками; λ — длина волны; A_1 — числовая апертура объектива; A_2 — числовая апертура конденсора.

Следовательно, в приведенном примере $\alpha = 0,55 / (0,65 + 1,0) = 0,33$ мкм, т.е. при этих условиях предел разрешения равен 0,33 мкм.

Повысить разрешающую способность микроскопа можно за счет применения более коротких лучей света или, что более доступно, за счет приближения показателя преломления среды, граничащей с линзой, к аналогичному показателю преломления стекла. С этой целью прослойку воздуха между линзой объектива и предметным стеклом замещают специальной жидкостью с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Особенно это необходимо при использовании объективов большого увеличения ($\times 90$ и больше) с фронтальными линзами малой площади. Показатель преломления стекла и воздуха составляет соответственно 1,52 и 1,0, поэтому в качестве иммерсионных жидкостей, создающих оптически однородную среду между предметным стеклом и линзой объектива, применяют чаще всего кедровое масло ($n = 1,5$), глицерин ($n = 1,4$), воду ($n = 1,3$). Ход лучей света при использовании обычного (сухого) и иммерсионного объективов показан на рисунке 3. Объективы для масляной иммерсии обозначают МИ, водной — ВИ.

Если апертура конденсора меньше апертуры рабочего объектива, то из-за слабого потока света возможности линзы объектива задействованы не полностью. Если апертура объектива меньше, чем апертура конденсора, что характерно для объективов малого увеличения, то уменьшают диаметр отверстия ирисовой диафрагмы конденсора.

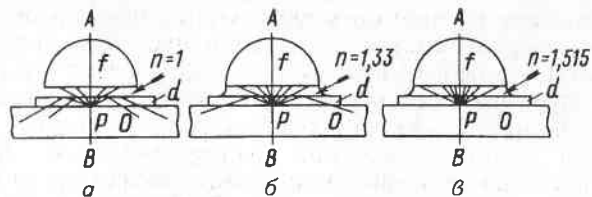


Рис. 3. Ход лучей в сухом (а), водно-иммерсионном (б) и масляно-иммерсионном (в) объективе:

n — показатель преломления; PO — препарат; f — фронтальная линза объектива; d — покровное стекло

Микроскопы необходимо хранить под чехлами или колпаками для защиты от пыли. Для наружной очистки оптики применяют смоченные спиртом мягкие ткани, не оставляющие после себя волокон. Использование ксилола и бензина для этих целей может привести к расклеиванию линз.

При микроскопировании существенное значение имеет освещение исследуемого объекта. Освещение чаще устанавливают по методу Келлера.

1. Осветитель (желательно использовать стандартные осветители ОИ-7 и ОИ-19, содержащие микролампу с небольшой плотно скрученной спиралью, которую можно передвигать вдоль оси осветителя) располагают на расстоянии 30...40 см от микроскопа.

2. На предметный столик ставят препарат, в рабочее положение переводят объектив $\times 8$.

3. Конденсор поднимают до упора, полностью открывают ирисовую диафрагму.

4. Зеркало устанавливают плоской поверхностью и почти полностью закрывают диафрагму осветителя.

5. На зеркало помещают лист белой бумаги и, передвигая патрон осветителя, добиваются четкого изображения на бумаге нити накала лампы.

6. Глядя в окуляр, при помощи зеркала получают в центре поля зрения изображение краев диафрагмы осветителя — светлое пятно с нерезко очерченными краями.

7. Используя объектив $\times 8$, фокусируют объект в области светлого пятна.

8. Опуская конденсор, в плоскости препарата фокусируют изображение краев диафрагмы осветителя и движением зеркала переводят светлое пятно в центр поля зрения.

9. Диафрагму осветителя открывают до тех пор, пока светлое пятно не закроет все поле зрения.

10. В дальнейшем положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не меняют.

В работе с учебными микроскопами освещение нередко устанавливают упрощенным способом. Приступая к работе с микроскопом, проверяют состояние конденсора: он должен быть поднят до уровня предметного столика, диафрагма открыта. Приподняв тубус микроскопа, устанавливают объектив с наименьшим увеличением ($\times 8$, $\times 10$); глядя в окуляр, при помощи зеркала добиваются полного освещения поля зрения. Затем на исследуемый препарат наносят каплю кедрового масла (или его заменителя), помещают препарат на предметный столик, поворотом револьвера устанавливают иммерсионный объектив. (Чтобы избежать соприкосновения объектива со столиком, тубус следует держать приподнятым.) Под контролем глаза (смотреть сбоку) фронтальную линзу объектива легким поворотом макрометри-

ческого винта погружают в каплю иммерсионного масла и, наблюдая в окуляр, осторожно поднимают тубус до видимости препарата. Затем легкими поворотами микрометрического винта (вперед-назад) регулируют четкость изображения.

В конце работы тубус приподнимают макровинтом, револьвер переводят в нейтральное положение, масло с линзы осторожно снимают мягкой хлопчатобумажной тканью. Микроскоп убирают в деревянный футляр или накрывают стеклянным колпаком (лучше из цветного стекла) для защиты от света.

Микроскопированием определяют морфологические особенности микроорганизмов, их тинкториальные свойства, подвижность, наличие специальных структурных элементов (спора, капсула).

Чтобы исследовать под микроскопом живые нефиксированные неокрашенные микроорганизмы, используют особые оптические системы: фазово-контрастное устройство и темнопольный конденсор.

Фазово-контрастное устройство. Включает в себя: а) фазовую пластинку — расположенный в задней фокальной плоскости объектива прозрачный диск, на поверхность которого напылено кольцо из металлов (фазовое кольцо); б) кольцевую диафрагму — помещенную под конденсором светонепроницаемую пластинку с прозрачным кольцевидным участком.

Световая волна при прохождении через живую клетку отстает по фазе приблизительно на $1/4$ длины волны и дополнительно сдвигается еще на $1/4$ после прохождения через фазовую пластинку. Ход лучей в фазово-контрастном устройстве показан на рисунках 4, 5. Сдвинутые по фазе после прохождения через фазовую пластинку лучи либо совпадают и складываются с прямыми лучами, идущими мимо объекта, либо оказываются в противофазе. В первом случае исследуемый объект виден как светлый на темном фоне, а во втором — как темный на светлом фоне. В микробиологии широко применяют фазово-контрастное устройство КФ-4 (рис. 6) (объект виден темным на светлом фоне). Далее приведена последовательность перехода к работе с фазово-контрастным устройством.

1. Обычный конденсор заменяют на фазово-контрастный, а объектив $\times 40$ — на аналогичный фазовый объектив.

2. Диск револьвера конденсора поворачивают до появления в окошечке цифры 0; диафрагму конденсора полностью открывают.

3. Используя объектив $\times 8$, устанавливают освещение по Келлеру.

4. Обычный окуляр заменяют на вспомогательный и с помощью тубуса добиваются четкого изображения фазовой пластинки в виде темного кольца.

5. Устанавливают кольцевую диафрагму, соответствующую

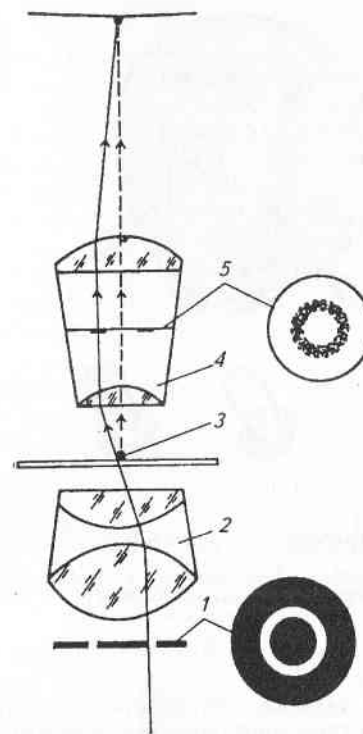


Рис. 4. Схема хода лучей при использовании фазово-контрастного устройства:

1 — кольцевая диафрагма; 2 — конденсор; 3 — объект; 4 — объектив; 5 — фазовая пластинка

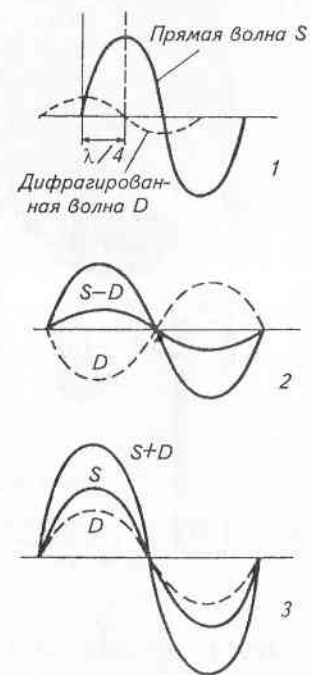


Рис. 5. Схемы, поясняющие принцип фазового контраста:

1 — сдвиг фаз между дифрагированной D и прямой S волнами; 2 — темный контраст; 3 — светлый контраст

объективу $\times 40$. В этом случае наряду с темным кольцом фазовой пластинки можно видеть светлое кольцо диафрагмы.

6. При помощи центрировочных винтов совмещают фазовое кольцо и кольцо диафрагмы.

7. Вспомогательный окуляр заменяют обычным и микроскопируют препарат. При работе с другими объективами устанавливают соответствующие диафрагмы.

Темнопольный конденсор. При темнопольной микроскопии используют специальный конденсор с затемненной центральной частью, поэтому в плоскость объекта идут только боковые лучи, отраженные от внутренних зеркальных поверхностей конденсора. Лучи направлены под таким углом, что не попадают в линзу объектива, и поэтому поле зрения выглядит темным (рис. 7). Та

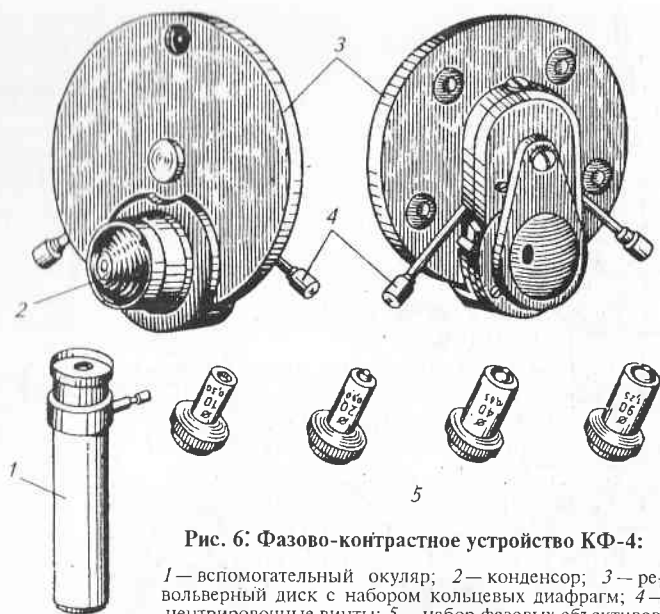


Рис. 6: Фазово-контрастное устройство КФ-4:

1 — вспомогательный окуляр; 2 — конденсор; 3 — револьверный диск с набором кольцевых диафрагм; 4 — центрировочные винты; 5 — набор фазовых объективов

часть лучей, которая попадает на объект, отражается в линзу объектива, что позволяет видеть светлое изображение объекта на темном фоне.

Чтобы перейти к методу темнопольной микроскопии, поступают следующим образом.

1. Вынимают окуляр, светлопольный конденсор и вывинчивают один из объективов ($\times 8$).

2. Прикрывают диафрагму осветителя и фокусируют нить накала лампы на листе белой бумаги, помещенном на зеркале (см. п. 5 Установки освещения по Келлеру).

3. Раскрывают диафрагму осветителя, закрывают матовым стеклом конец тубуса и с помощью зеркала добиваются равномерного освещения поля зрения.

4. Ставят на место окуляр, объектив $\times 8$, темнопольный конденсор, положение зеркала при этом не меняют.

5. На линзу конденсора наносят каплю дистиллированной воды, на столик помещают препарат «раздавленная капля» таким образом, чтобы вода на линзе конденсора контактировала с нижней поверхностью предметного стекла.

6. Глядя в окуляр, при помощи центрировочных винтов переводят в центр поля зрения светлое кольцо с темным пятном в центре. Далее регулируют видимость объекта в поле зрения.

Люминесцентный микроскоп (*lumen* — свет, *escent* — слабое действие). Ветеринарно-бактериологические лаборатории снабжены люминесцентными микроскопами серии МЛ (рис. 8) и новой серии «Люмам» (Р-1, Р-2, Р-3 — модели рабочего типа; И-1, И-2, И-3 — модели исследовательского типа).

Атомы некоторых веществ, называемых люминофорами (люминогены, флуорохромы), поглощая энергию, переходят на более высокий энергетический уровень (возбуждаются). Возбужденное состояние слабоустойчивое, атомы возвращаются на стабильный низкоэнергетический уровень, отдавая избыток энергии в виде свечения — люминесценции. В зависимости от источника энергии возбуждения различают фото-, электро-, радио-, хемо-, рентгенолюминесценцию.

В лабораторной практике в основном используют фотолюминесценцию — свечение, возбуждаемое энергией световых лучей. По длительности свечения различают люминесценцию кратковременную — флуоресценцию, быстро затухающую после прекращения воздействия возбуждающих лучей, и длительную — фосфоресценцию, продолжающуюся и после окончания возбуждения вещества. По правилу Стокса свет флуоресценции отличается от света возбуждения большей длиной волны, поэтому при освещении объекта невидимыми ультрафиолетовыми или корот-

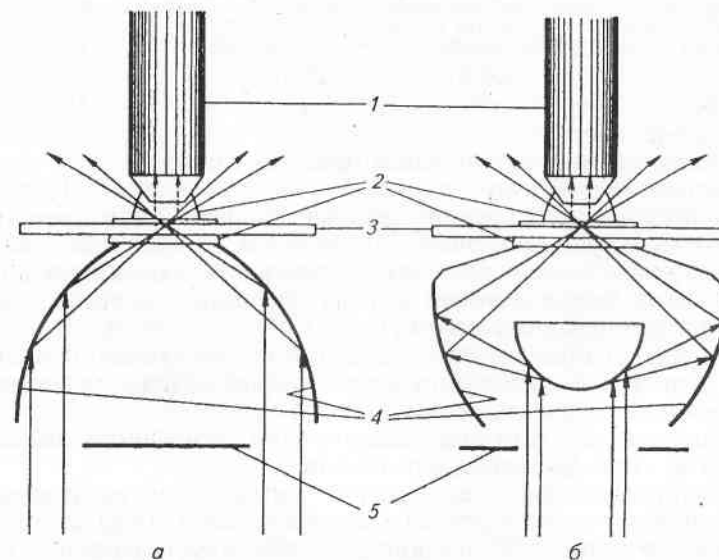


Рис. 7. Ход лучей в темнопольных конденсорах:

а — парабоид-конденсор; б — кардиод-конденсор; 1 — объектив; 2 — иммерсионное масло; 3 — препарат; 4 — зеркальная поверхность; 5 — диафрагма

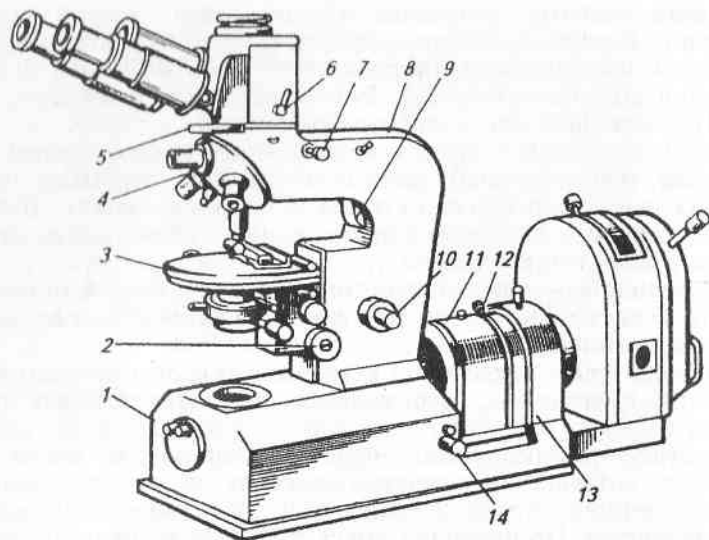


Рис. 8. Люминесцентный микроскоп МЛ-1:

1 — основание микроскопа; 2 — маховичок грубой подачи; 3 — предметный столик; 4 — револьверное устройство; 5 — поворотный диск со светофильтрами; 6, 7 — рукоятки подвижной трубки; 8 — тубусодержатель; 9 — рукоятка полевой диафрагмы; 10 — маховички микроподачи; 11 — откидной кожух; 12 — ручка диафрагмы; 13 — осветительное устройство; 14 — рукоятка откидного зеркала

кими сине-фиолетовыми лучами получают длинноволновые свечения объектов, хорошо видимые простым глазом.

Различают первичную и вторичную люминесценцию. Первичная люминесценция присуща практически всем веществам, однако интенсивность свечения большинства из них невелика. В микробиологии чаще применяют вторичную люминесценцию: обрабатывают биологический объект (препарат) специальными красителями — флуорохромами (акридин оранжевый, аурамин, флуоресцеин, уранин, родамин и др.), которые обладают интенсивной первичной люминесценцией. Флуорохромы, связываясь с определенными химическими структурами клетки, придают им способность ярко люминесцировать при освещении объекта (препарата) сине-фиолетовыми лучами.

В люминесцентных микроскопах источником возбуждения люминесценции служит ртутно-кварцевая лампа ДРШ-250. Чтобы провести успешную люминесцентную микроскопию: 1) из светового потока, идущего от ртутно-кварцевой лампы, с помощью специальных светофильтров выделяют коротковолновую (сине-фиолетовую) часть спектра для возбуждения свечения изучаемого объекта и отсекают лучи той же длины, что и лучи люми-

несценции (в противном случае все поле зрения будет интенсивно светиться). Для этого между источником света и исследуемым объектом ставят светофильтры типов УФС-3, ФС-1, СС-4 и др., которые называют «возбуждающими» светофильтрами; 2) из светового потока, идущего от изучаемого объекта в окуляр, пропускают длинноволновое свечение (люминесценцию) и одновременно защищают глаз наблюдателя от коротковолновых (возбуждающих) лучей. С этой целью между объектом и глазом наблюдателя помещают окулярные (запирающие) светофильтры типов ЖС-3, ЖС-18, Т-1Н и Т-2Н.

Сочетанное применение в оптической системе люминесцентного микроскопа фильтров целевого назначения (возбуждающие, запирающие) называют принципом скрещенных фильтров. Эффект скрещенных светофильтров обеспечивает цветную флуоресценцию объектов на темном фоне поля зрения (зелено-желтую).

Ход лучей в люминесцентном микроскопе показан на рисунке 9. Лучи от лампы ДРШ попадают на светоделительную пластинку, расположенную между объективом и окуляром. Ненужные длинноволновые лучи проходят через светоделительную пластинку и гаснут в кожухе микроскопа. Возбуждающие коротковолновые лучи пластинка отражает на изучаемый объект. Часть возбуждающих лучей трансформируется на объекте в длинноволновые лучи люминесценции, которые проходят через объектив, светоделительную пластинку, запирающие фильтры и попадают в глаз наблюдателя. Другую часть возбуждающих лучей, не претерпевших изменений, светоделительная пластинка отражает в

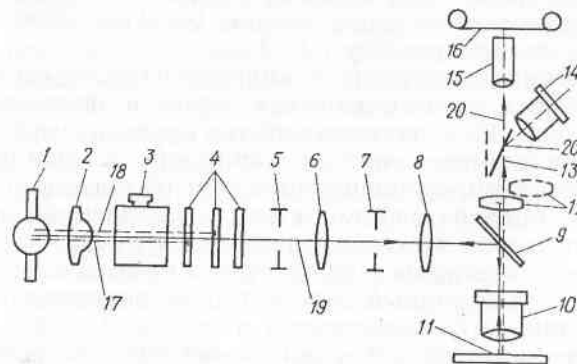


Рис. 9. Оптическая схема люминесцентного микроскопа МЛД, МЛ-3:

1 — ртутно-кварцевая лампа ДРШ; 2 — коллектор; 3 — кювета; 4 — сменные светофильтры; 5 — апертурная диафрагма; 6, 8 — собирающие линзы; 7 — полевая диафрагма; 9 — светоделительная пластинка; 10 — объектив; 11 — объект; 12 — запирающий светофильтр (сменный); 13 — зеркало; 14 — окуляр; 15 — фотоокуляр (гомал); 16 — фотопленка; 17 — тепловые лучи лампы; 18 — УФ-лучи; 19 — сине-фиолетовые лучи; 20 — лучи люминесценции

сторону источника света — лампы ДРШ. Такое дифференцирующее свойство светодельительной пластинки обусловлено тем, что она покрыта несколькими слоями диэлектриков и расположена под углом 45° по отношению к падающим на нее лучам.

Существенное отличие серии «Люам» от МЛ — наличие у «Люам» сменных светодельительных пластин с разными параметрами возбуждающего спектра и спектра люминесценции, комбинируемых с соответствующими запирающими фильтрами и фильтрами возбуждающего света.

При люминесцентной микроскопии в качестве иммерсионной жидкости используют специальное нефлуоресцирующее масло (обычное иммерсионное масло для этих целей непригодно из-за собственной люминесценции).

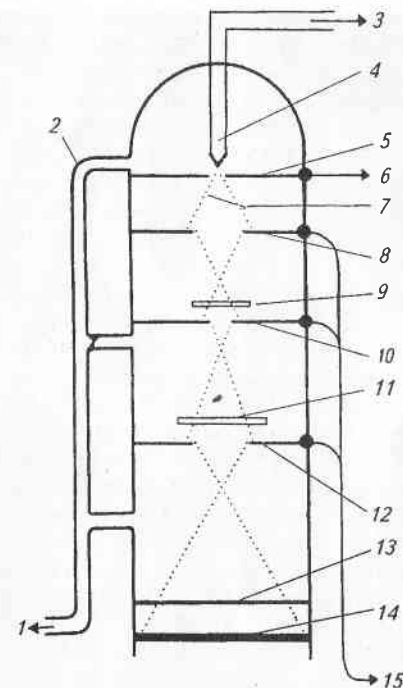
Преимущество люминесцентной микроскопии заключается в том, что она дает цветное изображение, высокую степень контрастности, возможность обнаруживать в исследуемом материале бактерии в небольших количествах. В микробиологии нашли применение такие виды исследований, как люминесцентная микроскопия флуорохромированных объектов и метод флуоресцирующих антител (МФА) в экспресс-диагностике инфекционных болезней.

Электронный микроскоп. Длина волн видимой области спектра лежит в пределах $0,4...0,7$ мкм, следовательно, максимальное разрешение (половина длины волны), которое можно получить при помощи светового микроскопа, — около $0,2$ мкм (200 нм). Волновые свойства также присущи электронам. При напряжениях $50\ 000...100\ 000$ В длина волны электрона составит $0,0055...0,0039$ нм. По чисто техническим причинам получить теоретически максимальное разрешение, равное $0,002$ нм, невозможно, и на практике оно не превышает $1...2$ нм.

Основная часть электронного микроскопа включает в себя ряд магнитных линз, люминесцентный экран и фотографическую пластинку (рис. 10). Электрический ток проходит через вольфрамовую нить и вызывает эмиссию электронов. К нити приложено высокое отрицательное напряжение, что обеспечивает большую разницу потенциалов между нитью и заземленной пластиной анода. В этом поле электроны движутся к аноду, часть из них проходит через отверстие в центре анода (центральная апертура) и формирует электронный луч, который фокусируется первой магнитной линзой (конденсорной) и освещает объект. Большая часть электронов проходит через объект без отклонения, часть электронов после столкновения с тяжелыми атомами выбивается из общего электронного луча. В итоге образуется такая структура электронного луча, которая при дополнительной фокусировке дает изображение объекта. Электроны, прошедшие через объект, фокусируются объективной магнитной линзой, которая дает увеличенное изображение; третья магнитная линза (проекционная),

Рис. 10. Схематический разрез колонны простейшего электронного микроскопа.

Путь электронного луча (точечная линия) изображен здесь так, как обычно изображают ход луча в оптических системах: 1 — к вакуумному насосу; 2 — вакуумная трубка; 3 — к высоковольтному источнику питания нити накала; 4 — нить (катод); 5 — анод; 6 — заземление; 7 — электронный луч; 8 — конденсорная линза; 9 — объект; 10 — объективная линза; 11 — увеличенное изображение объекта; 12 — проекционная линза; 13 — люминесцентный экран; 14 — фотографическая пластинка; 15 — к источнику питания линз



в свою очередь, также увеличивает изображение, которое и попадает на экран. Если люминесцентный экран убрать, то луч попадает на фотопластинку.

Электронный микроскоп, создающий изображение при прохождении электронов через тонкопленочный образец, называют трансмиссионным или просвечивающим. В сканирующем электронном микроскопе первичный электронный луч, попадая на поверхность фиксированного, высушенного и покрытого тонким слоем металла объекта, вызывает различные вторичные излучения, интенсивность которых зависит от характеристик рельефа, электропроводности и химического состава. Полезное увеличение сканирующей электронной микроскопии обычно не превышает $50\ 000$ раз. С ее помощью получают трехмерное изображение объекта (рис. 11).

Основные формы бактерий. Форма бактерий различных таксономических групп разнообразна (рис. 12), и ее обязательно учитывают при идентификации микроорганизма.

Кокки. Это бактерии шаровидной формы. В зависимости от взаимного расположения клеток различают микрোকки — отдельно лежащие кокки, диплококки — парно расположенные кокки, стрептококки — цепочки кокков, стафилококки — скопление кокков в виде виноградной грозди, тетракокки — структуры из четырех кокков, сарцины — многослойные структуры из $8...16$ кокков.

Палочковидные бактерии. Клетки цилиндрической формы, могут располагаться одиночно, парами — диплобактерии, цепочками — стрептобактерии. Палочковидные бакте-

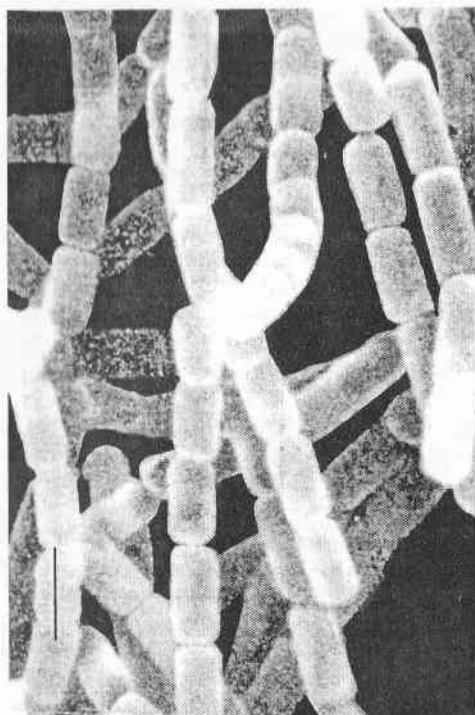
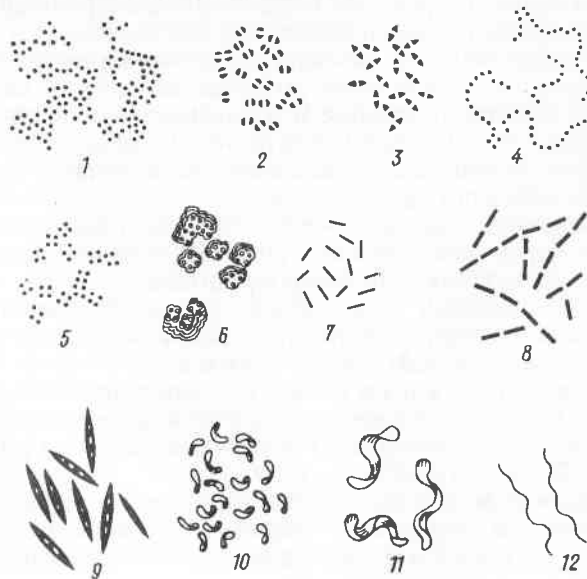


Рис. 11. Фотомикрография бактериальных клеток (сканирующий электронный микроскоп). Шкала 1 мкм



Рис. 12. Основные формы бактерий:

1 — стафилококки; 2, 3 — диплококки; 4 — стрептококки; 5 — тетракокки; 6 — сарцины; 7...9 — различные виды палочкообразных; 10 — вибрионы; 11 — спириллы; 12 — спирохеты



рии, образующие в неблагоприятных условиях специфическую форму существования — спору, диаметр которой не превышает диаметр клетки (аэробные палочковидные бактерии), называют бациллами. Если диаметр споры в клетке существенно превышает ее поперечный диаметр, то такие спорообразующие бактерии называют кластридиями (анаэробные палочки).

Извитые (спиралевидные) бактерии. К ним относят вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы — клетки в форме слегка изогнутых палочек; спириллы — бактерии, образующие до 6 завитков; спирохеты — бактерии со множеством (свыше 6) мелких завитков и в отличие от спирилл без жгутиков.

Ветвящиеся бактерии. Выраженная способность к ветвлению отмечена у прокариот из группы актиномицет; тенденцию к ветвлению на отдельных стадиях развития проявляют и другие бактерии, например микобактерии.

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

У большинства бактериальных клеток нет дифференциации на передний и задний концы, нижнюю и верхнюю стороны, т. е. функционально они равноценны, хотя есть исключения.

Полиморфизм. Это свойство некоторых видов бактерий в процессе роста на питательных средах образовывать формы, отличающиеся от типичной.

Определение размеров микроорганизмов. Размеры бактерий варьируют в широких пределах — от 0,2 мкм (микоплазмы) до 125 мкм (*Ochromotium oxaliferum*). Размеры большинства патогенных бактерий составляют от нескольких десятых микрометра до нескольких микрометров.

При характеристике размеров бактерий обычно указывают длину и ширину клетки в микрометрах (10^{-3} мм). В качестве инструментов измерения используют окуляр- и объект-микрометры.

Окуляр-микрометр. Это стеклянная пластинка, на которой линия в 5 мм разделена на 10 или 20 делений (размещают в окуляре).

Объект-микрометр. Представляет собой предметное стекло с линией длиной 0,5 или 1,0 мм, разделенной на сотые доли (рис. 13, 14).

Объект-микрометр помещают на предметный столик и, глядя в окуляр с окуляр-микрометром, совмещают начальную черту в объект- и окуляр-микрометрах. Затем определяют цену деления окуляр-микрометра при данных окуляре и объективе. Например: шкала объект-микрометра составляет 1 мм и одно ее деление равно 10^{-2} мм, т. е. 10 мкм.

При совмещении шкалы объект-микрометра три его деления (т. е. 30 мкм) соответствуют 14 делениям окуляр-микрометра, отсюда одно деление окуляр-микрометра составляет $30:14 =$

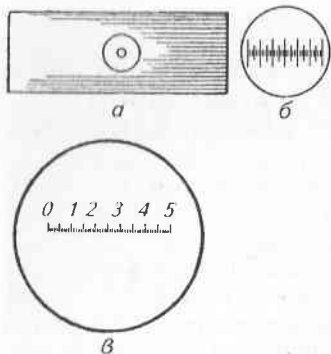
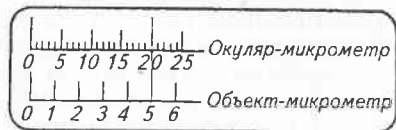


Рис. 13. Микрометры:

а — общий вид объект-микрометра; б — объект-микрометр; в — окуляр-микрометр

Рис. 14. Определение цены деления окуляр-микрометра



$= 2,14$ мкм. После того как определена цена одного деления окуляр-микрометра, вместо объект-микрометра помещают препарат с исследуемым объектом. Например, палочковидный микроб по длине занимает 3, а по ширине — 0,5 деления окуляр-микрометра. Если одно деление окуляр-микрометра составляет 2 мкм, то длина бактериальной клетки будет $3 \cdot 2 = 6$ мкм, а ширина — $0,5 \cdot 2 = 1$ мкм.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с бактериологической лабораторией, ее основным оборудованием, правилами техники безопасности.
2. Изучить устройство светового микроскопа, установку освещения по Келлеру, принципы фазово-контрастной, темнопольной, люминесцентной и электронной микроскопии.
3. Освоить приемы работы с иммерсионным объективом микроскопа.
4. Провести микроскопию препаратов с бактериями различной формы.
5. Определить размеры бактериальных клеток.

Контрольные вопросы

1. Каковы основные правила работы в бактериологической лаборатории?
2. Как проходят лучи в иммерсионной системе, фазово-контрастном устройстве микроскопа, темнопольном конденсоре, люминесцентном микроскопе?
3. Каковы основные формы бактерий?
4. Как определяют размеры микроорганизмов?

Тема 2

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СВЕТОЙ МИКРОСКОПИИ. ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Цель занятия. Ознакомить студентов с основными бактериологическими красителями, техникой их приготовления и методом простой окраски бактериальных препаратов.

Оборудование и материалы. Набор сухих бактериологических красок и их растворов, культуры бактерий на МПА и в МПБ (*E. coli*, *S. aureus*), световые микроскопы, обезжиренные предметные стекла, фуксин Пфейффера, красящие бумажки по Сивеву, раствор метиленового синего, фильтровальная бумага для высущивания мазков, физиологический раствор.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Обычно форму, взаимное расположение, некоторые особенности химического состава и строения бактериальных клеток определяют путем микроскопии окрашенных препаратов. Оптическая плотность неокрашенных бактерий близка к оптической плотности стекла, поэтому бактерии плохо различимы при микроскопировании. Окрашенные клетки, наоборот, четко видны. Кроме того, безвредные микроорганизмы в процессе обработки инактивируются, что делает препарат безопасным для исследователя.

Отношение к различным красителям и методам окраски называют тинкториальными свойствами микроорганизмов.

Бактериологические красители. Для окрашивания бактериальных клеток применяют синтетические анилиновые красители, которые дифференцируют на основные и кислые. У основных красителей ион, придающим бактериальной клетке окраску, служит катион, у кислых — анион. Структуры бактерий, взаимодействующие с красителем, преимущественно отрицательно заряжены и поэтому лучше воспринимают основные красители.

Основные красители. Красные (нейтральный красный, пиронин, сафранин, основной фуксин); фиолетовые (генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, гематоксилин, тионин); синие (виктория, метиленовый синий); зеленые (малахитовый зеленый, метиленовый зеленый, янус зеленый); коричневые (верулин, хризоидин); черные (индулин).

Кислые красители. Розовые и красные (кислый фуксин, эозин, тригрозин, гропеолин); желтые (аурантил, конго, пикриновая кислота); черные (нигрозин).

Спиртовые растворы. Эти растворы длительного хранения готовят из сухих порошковых красок. Растворы сначала выдерживают в термостате для лучшего растворения веществ, затем фильтруют через бумажные фильтры, чтобы избавиться от нераствор-

рившихся микрочастиц, которые при окраске препаратов оседают на клетках, тем самым затрудняя их изучение под микроскопом.

Далее приведены рецепты спиртовых растворов красок, наиболее часто применяемых в микробиологии.

Карболовый фуксин Циля: раствор *А*: основной фуксин — 0,3 г, 96%-й этанол — 10 мл; раствор *Б*: фенол — 5 г, вода дистиллированная — 95 мл. Растворы *А* и *Б* смешивают.

Фуксин Пфейффера — это фуксин Циля, разведенный водой в соотношении 1 : 10 (из-за нестойкости используют только в течение рабочего дня).

Карболовый кристаллический фиолетовый: раствор *А*: кристаллический фиолетовый — 0,4 г, 96%-й этанол — 10 мл; раствор *Б*: фенол — 1 г, вода дистиллированная — 100 мл. Растворы *А* и *Б* смешивают.

Щелочной метиленовый синий Леффлера: раствор *А*: метиленовый синий — 0,3 г, 96%-й этанол — 30 мл; раствор *Б*: 0,01%-й раствор гидроксида калия — 100 мл. Растворы *А* и *Б* смешивают.

Водные растворы. Так как эти растворы красителей нестойкие, их готовят непосредственно перед использованием (*ex tempore*).

Раствор сафранина: сафранин — 2 г, вода дистиллированная горячая ($t = 90^\circ\text{C}$) — 100 мл. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор малахитового (бриллиантового) зеленого: малахитовый зеленый — 1 г, вода дистиллированная горячая — 100 мл. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор Люголя — стойкий раствор используют для окраски по методу Грама: йод кристаллический — 1 г, йодид калия — 2 г, вода дистиллированная — 10 мл. Смесь выдерживают 24 ч при 37°C , после чего добавляют дистиллированную воду до 300 мл и одну-две капли глицерина.

Приготовление бактериальных препаратов для световой микроскопии. Приготовление окрашенных бактериальных препаратов включает в себя приготовление мазка, его высушивание, фиксацию и окрашивание. Материалом для исследования служат культуры бактерий на плотных или жидких питательных средах или нативный материал: органы, ткани, воспалительный экссудат и т. д. Препараты готовят на чистых, обезжиренных предметных стеклах.

На предметное стекло наносят исследуемый материал. Если материал жидкий и находится в бактериологической пробирке (бульонная культура), то пробирку берут в левую руку, в правую — бактериологическую петлю (как пишущее перо), прожигают ее в пламени горелки, мизинцем правой руки захватывают пробку и над пламенем горелки извлекают ее из пробирки, края пробирки обжигают. Петлей, не смачивая петледержатель, берут

материал и распределяют на предметном стекле по площади размером 2 см^2 . Края пробирки вновь обжигают, закрывают ее пробкой, обжигают бактериологическую петлю.

Аналогичным образом готовят мазок из агаровой культуры, осторожно захватывая петлей бактериальную массу с поверхности питательной среды. На предметное стекло в этом случае предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора, в котором петлей суспендируют бактериальную массу.

Из животных тканей готовят мазки-отпечатки: стерильно вырезают кусочек органа, поверхностью среза несколько раз касаются поверхности предметного стекла.

Приготовленный мазок высушивают на воздухе.

Мазок фиксируют для прикрепления бактериальных клеток к поверхности стекла и их инактивации. Применяют физический и химический способы фиксации. При физическом способе препарат обратной стороной стекла два-три раза медленно проводят над пламенем горелки. Чрезмерное нагревание вызывает изменение формы клетки и ее тинкториальных свойств. При химическом способе на предметное стекло с мазком наносят одну из следующих жидкостей: 96%-й этанол — на 10 мин; ацетон — на 5 мин; смесь этанола и эфира (соотношение 1 : 1) — на 10...15 мин.

Фиксированный препарат окрашивают одним из методов.

Раствор краски смывают дистиллированной водой, препарат подсушивают фильтровальной бумагой или на воздухе и микроскопируют.

Процедуру окрашивания препарата проводят на «мостике» (параллельные стеклянные трубки) над сливной чашкой.

Простые методы окраски бактерий. При этом способе окрашивания используют один краситель: например, на мазок наносят фуксин Пфейффера на 2...3 мин или метиленовый синий Леффлера на 3...10 мин. В таком препарате можно определять форму клеток, их взаимное расположение.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

Приготовить препараты бактерий из бульонных и агаровых культур, окрасить одним из красителей простым методом.

Контрольные вопросы

1. Какие бактериологические красители наиболее часто применяют в лабораторной практике?
2. Как их готовят?

Тема 3

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ: ОКРАСКА ПО МЕТОДАМ ГРАМА И ЦИЛЯ–НИЛЬСЕНА

Цель занятия. Ознакомить студентов со сложными методами окраски, с помощью которых дифференцируют грациликотные, фирмикотные и кислотоустойчивые бактерии.

Оборудование и материалы. Смесь культур *E. coli* и *S. aureus*, смесь *E. coli*, *S. aureus* и микобактерий (вакцина БЦЖ), красители для окраски бактерий по методам Грама и Циля–Нильсена, световые микроскопы, бактериологические петли, 96%-й этанол, фильтровальная бумага, предметные обезжиренные стекла, 5%-й раствор серной кислоты, дистиллированная вода.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

При сложных методах окраски используют несколько различных красителей, что позволяет выявить особенности строения и химического состава клетки.

Окраска бактерий по методу Грама. Это один из наиболее распространенных сложных методов окраски, основан на различиях в строении и химическом составе клеточной стенки. В зависимости от результатов окрашивания все бактерии подразделяют на грамположительные и грамотрицательные.

При окрашивании генциановый фиолетовый в присутствии йода образует комплекс с компонентами клеточной стенки. У грамположительных прокариот клеточная стенка при обработке этанолом удерживает образовавшийся комплекс и бактерии окрашены в фиолетовый цвет; у грамотрицательных этанол вымывает этот комплекс и после дополнительного окрашивания препарата фуксином клетки приобретают красный цвет.

Этапы окраски. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную спиртовым раствором генциан кристалл- или метилвиолета (бумажки по Синеву), наносят на нее несколько капель дистиллированной воды для увлажнения, выдерживают 1...2 мин, бумажку удаляют. Препарат, не промывая, обрабатывают раствором Люголя 1...2 мин; раствор сливают. Затем наносят 96%-й этанол на 30...45 с, после чего препарат тщательно промывают водой и окрашивают фуксином Пфейффера 1...2 мин. Вновь промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: бактерии, окрашенные в темно-фиолетовый цвет, относят к грамположительным, или фирмикотам, в красный цвет — к грамотрицательным, или грациликотам.

Основная сложность окраски по методу Грама — опасность

переобесцвечивания препарата этанолом. Чтобы избежать переобесцвечивания, разработан ряд модификаций, например модификация Хукера.

Модификация Хукера. Готовят следующие красители: раствор А: кристалливиолет — 2 г, 96%-й этанол — 20 мл; раствор В: оксалат аммония — 0,8 г; дистиллированная вода — 80 мл. Растворы А и В смешивают в темном флаконе и оставляют при комнатной температуре на 24 ч. Раствор В: 2,5%-й раствор сафранина (в 96%-м этаноле) — 10 мл, дистиллированная вода — 100 мл.

Фиксированный нагреванием мазок погружают в смесь растворов А и В на 1 мин, после чего препарат промывают водой и обрабатывают раствором Люголя 1 мин, затем вновь промывают водой и подсушивают. Наносят 96%-й этанол на 30 с, препарат тщательно промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и окрашивают раствором В 10 с, промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Окраска бактерий по методу Циля–Нильсена. Кислотоустойчивые бактерии — грамположительные, однако повышенное содержание в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты придает клетке гидрофобные свойства, затрудняющие проникновение в нее красителя и усиливающие ее устойчивость к воздействию растворов кислот. Исходя из этих особенностей был разработан метод, с помощью которого выявляют кислотоустойчивые виды.

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

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

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Из культур *E. coli* и *S. aureus* приготовить мазки, окрасить по методу Грама, промикроскопировать и зарисовать.
2. Приготовить из смеси микобактерий (БЦЖ), *E. coli*, *S. aureus* мазки, окрасить по методу Циля–Нильсена, промикроскопировать и зарисовать.

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлены тинкториальные особенности грамположительных и грамотрицательных бактерий?
2. На каких особенностях кислотоустойчивых бактерий основан метод окраски по Цилю–Нильсену?

Тема 4

ОКРАСКА БАКТЕРИЙ С ЦЕЛЮ ВЫЯВЛЕНИЯ СПОР, КАПСУЛ, ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВКЛЮЧЕНИЙ. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЖГУТИКОВ. МЕТОД ПРЯМОГО ФЛУОРОХРОМИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами обнаружения у бактерий спор, капсул, жгутиков, цитоплазматических включений методом прямого флуорохромирования бактерий.

Оборудование и материалы. 24-часовая культура *P. multocida* на сыровоточном МПА, культура *B. cereus* на МПА на стадии спорообразования; сенной настой, красители, предметные и покровные стекла, световые микроскопы.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

Споры с большим трудом воспринимают красители, но прочно удерживают их после окраски (рис. 15). На этой особенности

спор основаны все методы их выявления. Для окрашивания спор применяют красители с протравителями (карболовый фуксин и др.) и подогревание, чтобы увеличить проницае-

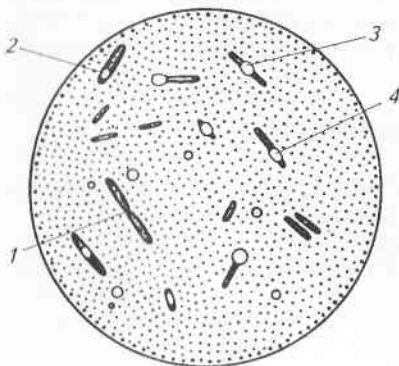


Рис. 15. Бациллы с различным расположением спор:

1 — вегетативная клетка; 2 — субтерминальное; 3 — центральное; 4 — терминальное

мость оболочки. Для разрыхления оболочки иногда перед окраской препараты обрабатывают хромовой или другими неорганическими кислотами.

Метод Мёллера. Фиксированный мазок обрабатывают 5%-м раствором хромовой кислоты при легком подогревании 10 мин, промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой. Затем на фильтровальную бумагу (1 см²), помещенную на мазок, наносят карболовый фуксин и подогревают до появления паров, дают остыть, повторяют нагревание два-три раза. Общая экспозиция окрашивания карболовым фуксином 7 мин (мазок должен быть влажным). Бумажку с краской сбрасывают бактериальной петлей; не промывая водой, мазок обрабатывают 5%-м раствором серной кислоты 5...7 с, после чего тщательно промывают водой и докрашивают метиленовым синим 3 мин. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

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

Метод Вальдмана. На фиксированный мазок наносят щелочную синьку Леффлера и нагревают до кипения, дают остыть и промывают водой. Докрашивают 1%-м водным раствором нейтральрота 30 с, промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: споры синие, вегетативные клетки красные.

Метод Пешкова. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым синим с подогреванием до закипания, затем промывают водой и докрашивают 1%-м водным раствором нейтральрота 10 с. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: споры синие, вегетативные клетки красные.

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

Микроскопическая картина: споры красные, вегетативные клетки синие.

Метод Шеффера–Фултона. Фиксированный мазок покрывают фильтровальной бумагой, наливают 0,5%-й водный раствор малахитовой зелени и выдерживают 5 мин над кипящей водой, после чего промывают водой и окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 30 с. Препарат промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: споры зеленые, вегетативные клетки красно-коричневые.

Выявление капсул бактерий. Капсула — это слизистое образование, обволакивающее клетку и сохраняющее связь с клеточной стенкой. У большинства прокариот капсула построена из полисахаридов гомо- или гетерополимерной природы. У некоторых видов бактерий капсула содержит полипептид — полимер *D*-глутаминовой кислоты. Вещество капсулы обычно воспринимает краситель слабее, чем другие клеточные компоненты, поэтому при специальных методах окраски можно дифференцировать капсулу от остальных структур. Многие виды патогенных бактерий образуют капсулу, которая выполняет защитную функцию в основном за счет снижения эффективности фагоцитоза (рис. 16).

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

Микроскопическая картина: капсула розовая, клетки синие.

Метод Ольта. Фиксированный мазок окрашивают при подогревании 2%-м водным раствором сафранина, приготовленным *ex tempore*. Экспозиция окрашивания 1...2 мин. Затем промывают водой, подсушивают. На мазок наносят каплю воды, накрывают покровным стеклом.

Микроскопическая картина: капсула бледно-желтая, клетка красно-коричневая.

Метод Антони. Нефиксированный мазок обрабатывают 1%-м водным раствором кристаллвиолета 2 мин, после чего промывают

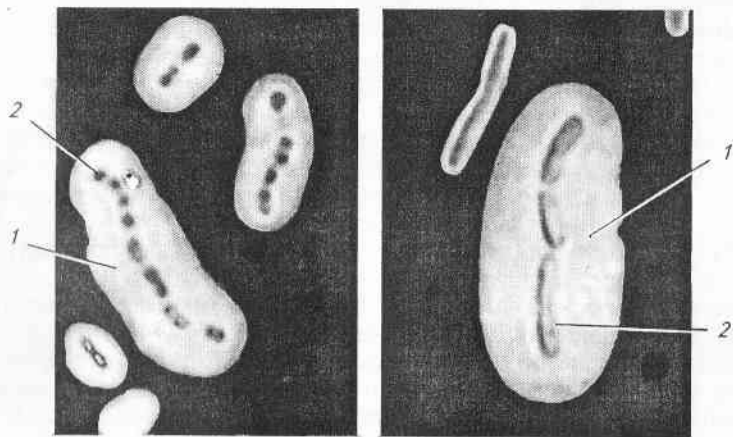


Рис. 16. Капсулы бактерий:

1 — капсульное вещество; 2 — бактериальная клетка. Контрастирование тушью

ют 20%-м водным раствором сульфата меди и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: капсулы сине-фиолетовые, клетки темно-синие.

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

Микроскопическая картина: капсула розовая, клетка темно-синяя.

Метод Ребигера. Нефиксированный мазок окрашивают 15...20 с раствором генцианвиолета в формалине (генцианвиолет — 15...20 г, 40%-й раствор формалина — 100 мл, раствор отстаивают, фильтруют). Препарат промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: капсула красно-фиолетовая, клетка темно-фиолетовая.

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

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

Микроскопическая картина: капсула бледно-голубая, клетка темно-фиолетовая, фон фиолетовый.

Метод Гисса. На край предметного стекла помещают каплю черной туши, предварительно разведенной дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 и центрифугированной при 3000 мин⁻¹ 15 мин. В капле туши петлей суспендируют бактериальную массу. Вторым предметным стеклом суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла, т. е. мазок готовят так же, как мазки из капли крови. Мазок высушивают, фиксируют на пламени и окрашивают карболовым фуксином Циля, разведенным дистиллированной водой в соотношении 1 : 3. Экспозиция окрашивания 4...5 мин. Препарат промывают водой и подсушивают.

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

Выявление цитоплазматических включений. При идентификации прокариот имеет значение обнаружение в их цитоплазме скоплений определенных химических веществ (включений): полифосфатов — волютина (метахроматина), полисахаридов — глюканов, состоящих из *D*-глюкозы и некоторых других соединений.

Обнаружение волютина (по методу Нейссера). Готовят четыре раствора. Раствор *A*: метиленовый синий — 0,1 г, 96%-й этанол — 2 мл, ледяная уксусная кислота — 5 мл, вода дистиллированная — 300 мл. Раствор *B*: кристаллвиолет — 1 г, 96%-й этанол — 100 мл, вода дистиллированная — 300 мл. Раствор *B*: раствор Люголя. Раствор *Г*: хризоидин — 1 г, вода дистиллированная — 300 мл.

На фиксированный препарат наливают смесь растворов *A* и *B* в соотношении 2 : 1 на 1 мин, краску сливают. Мазок, не промывая, обрабатывают раствором *B* 1 мин и промывают водой. Затем на препарат наносят раствор *Г* на 2...3 мин, промывают водой, высушивают.

Микроскопическая картина: клетки светло-желтые, зерна волютина темно-синие.

Обнаружение поли-β-оксимасляной кислоты. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 0,3%-м раствором судана черного «В» в этиленгликоле 5...15 мин. Краску сливают и препарат, не промывая, подсушивают на воздухе, затем ополаскивают в ксилоле, высушивают и погружают в 0,5%-й водный раствор сафранина на 5...10 с, промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: включения видны на розовом фоне в виде черно-синих зерен.

Обнаружение полисахаридов. На фиксированный препарат наносят 1%-й спиртовой раствор алцианового синего на 1 мин (краситель перед использованием разводят водой в соотношении 1 : 8). Препарат промывают водой, подсушивают, затем обрабатывают карболовым фуксином Циля и сразу же промывают водой, подсушивают.

Микроскопическая картина: цитоплазма красного цвета, полисахаридные включения — голубого.

Методы обнаружения жгутиков у бактерий. Жгутики — структуры нитевидной формы, белковой природы, определяют способность клетки к движению в жидкой среде (рис. 17). Количество и характер расположения жгутиков у бактерий различны. У монотрихов один-два жгутика расположены на одном из полюсов клетки (*Pseudomonas*); у лофотрихов пучок жгутиков расположен полярно или субполярно (*Spirillum*); у амфитрихов жгутики — на обоих полюсах клетки; у перитрихов — по всей поверхности клетки (*Enterobacteriaceae*).

Монотрихи двигаются прямолинейно и поступательно, при необходимости могут изменить направление движения на 180° (клетка переворачивается); движение лофотрихов прямолиней-

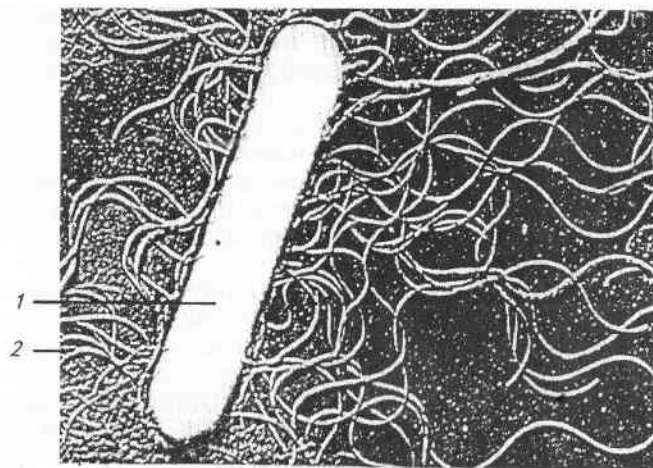


Рис. 17. Жгутики у бактерий (электронная микроскопия):

1 — бактериальная клетка (*Cl. tetani*); 2 — жгутики

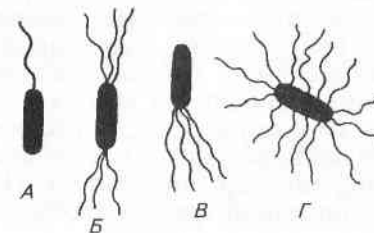
ное вперед или назад; перитрихи передвигаются хаотично (рис. 18).

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

Метод серебрения по Морозову. Готовят четыре раствора. Раствор *A*: вода дистиллированная — 100 мл, 40%-й раствор формалина — 2 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл. Раствор *B*: танин — 5 г, жидкая карболовая кислота — 1 мл, вода дистиллированная — 100 мл. Раствор *B*: нитрат серебра — 5 г, дистиллиро-

Рис. 18. Расположение жгутиков у бактерий:

A — монотрихи; *B* — амфитрихи; *B* — лофотрихи; *Г* — перитрихи



ванная вода — 100 мл. К 80 мл этого раствора по каплям добавляют аммиак до растворения осадка и образования легкой опалесценции. Для окраски раствор серебра разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10.

На препарат наносят раствор *A* на 1 мин, затем раствор сливают и препарат промывают водой, обрабатывают раствором *B* и подогревают 1 мин до отхождения паров, промывают водой, после чего наносят раствор *B* и подогревают 1...2 мин до появления темно-коричневой окраски мазка, промывают водой, подсушивают.

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

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

Препарат «раздавленная капля». На чистое обезжиренное предметное стекло пастеровской пипеткой наносят одну-две капли 18...20-часовой бульонной культуры, накрывают чистым покровным стеклом. Количество жидкости должно быть достаточным для заполнения всего пространства под покровным стеклом. Микроскопируют с объективом $\times 40$ или $\times 90$. Неокрашенные бактерии лучше видны при легком затемнении поля зрения, поэтому конденсор целесообразно опустить на 5...10 мм ниже плоскости предметного столика. Клетки видны в виде светлых или серых «теней», при объективе $\times 90$ четко видны только клетки, передвигающиеся в горизонтальной плоскости; бактерии, двигающиеся вертикально, быстро уходят из зоны четкого изображения.

Препарат «висячая капля». Каплю исследуемой культуры бактериологической петлей наносят на чистое покровное стекло. Берут специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре, края лунки смазывают вазелином, стекло переворачивают лункой вниз и прижимают к покровному таким образом, чтобы капля с бактериями была в центре лунки. Затем предметное стекло резко переворачивают, и капля висит под покровным стеклом в лунке. При микроскопии бактериальные клетки легче обнаружить по краю капли, где слой жидкости тоньше.

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

Помимо перечисленных методов для выявления жгутиков нередко прибегают к посеву исследуемой культуры уколом в полужидкий агар (см. тему 8). Подвижные бактерии растут по всей питательной среде в пробирке, неподвижные — только по уколу.

Метод прямого флуорохромирования бактерий. Для обнаружения некоторых видов бактерий и их отдельных структур препараты обрабатывают флуорохромами с последующим изучением в люминесцентном микроскопе. Наиболее широко этот метод применяют для выявления возбудителя туберкулеза.

Готовят следующие растворы: раствор *A* (фиксатор Никифорова): 96%-й этанол, серный эфир — в соотношении 1:1; раствор *B*: аурамин 00 — 0,1 г, дистиллированная вода — 100 мл, 6%-й раствор фенола — 0,5 мл; раствор *B*: 96%-й этанол — 90 мл, соляная кислота — 4 мл, хлорид натрия — 4 г, объем доводят дистиллированной водой до 100 мл; раствор *Г* («тушитель»): кислый фуксин — 1 г, дистиллированная вода — 390 мл, концентрированная уксусная кислота — 10 мл.

Мазки из исследуемого материала готовят, как для обычной микроскопии, фиксируют раствором *A*; окрашивают раствором *B* 15 мин, промывают водой, затем обрабатывают раствором *B* 5 мин, промывают водой, наносят раствор *Г* на 2 мин, после чего препарат промывают водой и подсушивают.

Микроскопическая картина: при объективе $\times 40$ туберкулезные бактерии видны в виде золотистых черточек; под объективом $\times 90$ (иммерсионным) на темном фоне обнаруживают светящиеся золотисто-зеленые палочки возбудителя.

Демонстративен способ выявления спор бактерий при окрашивании бриллиант-сульфофлавином, триафлавином.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить, окрасить и промикроскопировать препарат бактерий со спорами (*B. cereus*).
2. Окрасить одним из способов капсулы *P. multocida* и промикроскопировать.
3. Приготовить препарат «раздавленная капля» из сенного настоя, обнаружить методом микроскопии подвижные клетки бактерий.

Контрольные вопросы

1. На каких тинкториальных особенностях спор и капсул основаны методы их окраски?
2. Какие прямые и косвенные методы применяют для обнаружения бактериальных жгутиков?
3. Какое значение имеет выявление цитоплазматических включений для идентификации прокариот?

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ

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

Оборудование и материалы. Грибные культуры родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* на плотных средах в чашках Петри, суспензия дрожжей в бактериологических пробирках, предметные и покровные стекла, микологические крючки или препаровальные иглы, световой микроскоп.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Грибы — это хемоорганотрофные микроорганизмы с эукариотической клеточной организацией, лишены фотосинтетических пигментов, широко распространены в природе. Грибы относят к царству *Fungi* (лат.) или *Mycota* (греч.), включающему в себя около 120 000 видов. Для ветеринарии наибольшее значение имеют микроскопические грибы, вызывающие патологию у животных и людей, — представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Candida*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Stachybotrys*, *Dendrodochium*.

Морфология грибов. У большинства видов вегетативное тело (таллом) состоит из ветвящихся нитевидных клеток (гифов), образующих мицелий, или грибницу. Нитевидные грибы (гифомицеты) условно называют плесневыми. Существуют и одноклеточные неветвящиеся грибы — дрожжи, дрожжеподобные (рис. 19).

Различают мицелий субстратный, контактирующий с питательной средой, и воздушный, возвышающийся над ней. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра инокуляции к периферии, формируя колонию. Для прикрепления к субстрату и потребления из него питательных веществ мицелий у некоторых видов образует корешкообразные выросты — ризоиды. К видоизменениям мицелия относят также склероции — округлые или продолговатые сплетения гифов, содержащие много питательных веществ, необходимых грибу при неблагоприятных условиях (рис. 20).

По строению мицелия грибы подразделяют на два класса.

Низшие грибы (фикомицеты). Этот класс характеризуется несептированным мицелием, который представлен одной сильно разветвленной гигантской клеткой без перегородок и с многочисленными ядрами.

Высшие грибы (микомицеты). Характеризуются септированным мицелием: гифы мицелия разделены перегородками (септы,

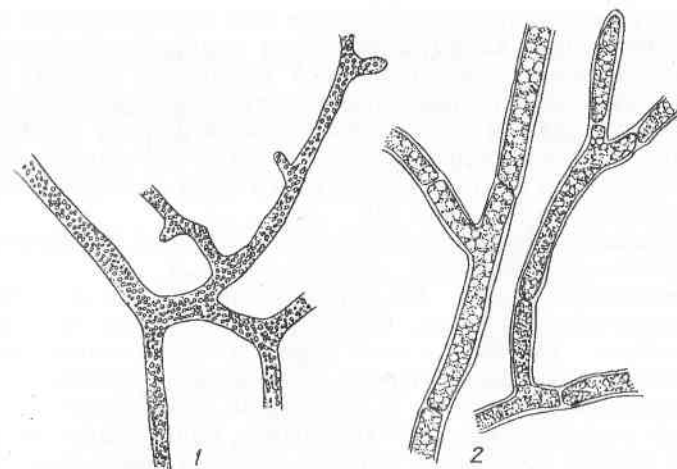


Рис. 19. Вегетативное тело грибов:

- 1 — несептированный мицелий;
2 — септированный мицелий; 3 —
почкующиеся клетки дрожжей;
4 — псевдомицелий дрожжей

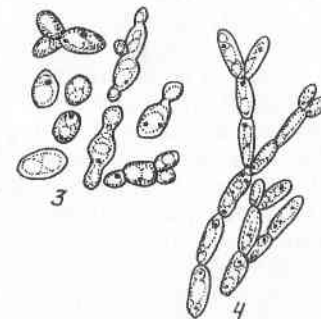
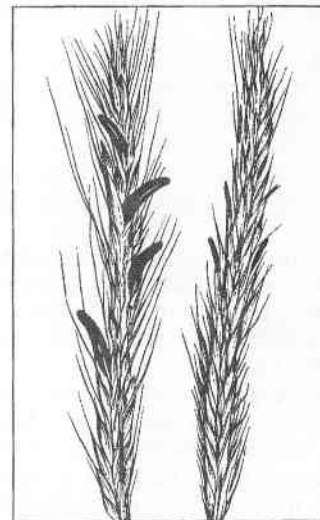


Рис. 20. Склероции грибов в пораженном зерне



септумы) на отдельные одноядерные или многоядерные клетки. Цитоплазма одной клетки сообщается с цитоплазмой соседней через пору в центре перегородки. У некоторых высших грибов (дрожжи) мицелий отсутствует, а вегетативное тело представлено отдельными клетками с клеточной стенкой. Если в процессе деления или почкования дрожжевые клетки не расходятся, то образуются скопления клеток, которые называют ложным мицелием (псевдомицелием) (см. рис. 19).

Размножение грибов. Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения.

Вегетативный способ. Это размножение происходит без участия специальных органов, простым распадением мицелия на обособленные клетки: хламидоспоры — концевые или интеркалярные — одноклеточные или многоклеточные участки гиф разнообразной формы с диаметром, превышающим длину исходной клетки; оидии — отдельные, чаще овальной формы клетки с тонкой оболочкой, диаметр которых равен диаметру исходной гифы; артроспоры — прямоугольные или многогранные, поднимаются в виде четок над гифами воздушного мицелия и распадаются на отдельные клетки; бластоспоры — округлой формы, формируются на мицелии путем почкования.

Все названные виды спор представляют собой формы измененного мицелия и способны при благоприятных условиях образовывать новый мицелий (рис. 21).

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

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

Спорангиоспоры — неподвижные, с твердой оболочкой, образуются обычно у низших грибов внутри шарообразных спорангиев, находящихся на особых ответвлениях гифов — спорангиеносцах (рис. 22).

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

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

Половое размножение: в результате слияния ядер двух клеток и последующего редукционного деления образуются специализированные гифы с органами полового спороношения — сумками (асками) у аскомицетов и базидиями у базидиомицетов. Внутри аска развиваются аскоспоры, на поверхности базидии — базидиоспоры. К аскомицетам относят дрожжи, не-

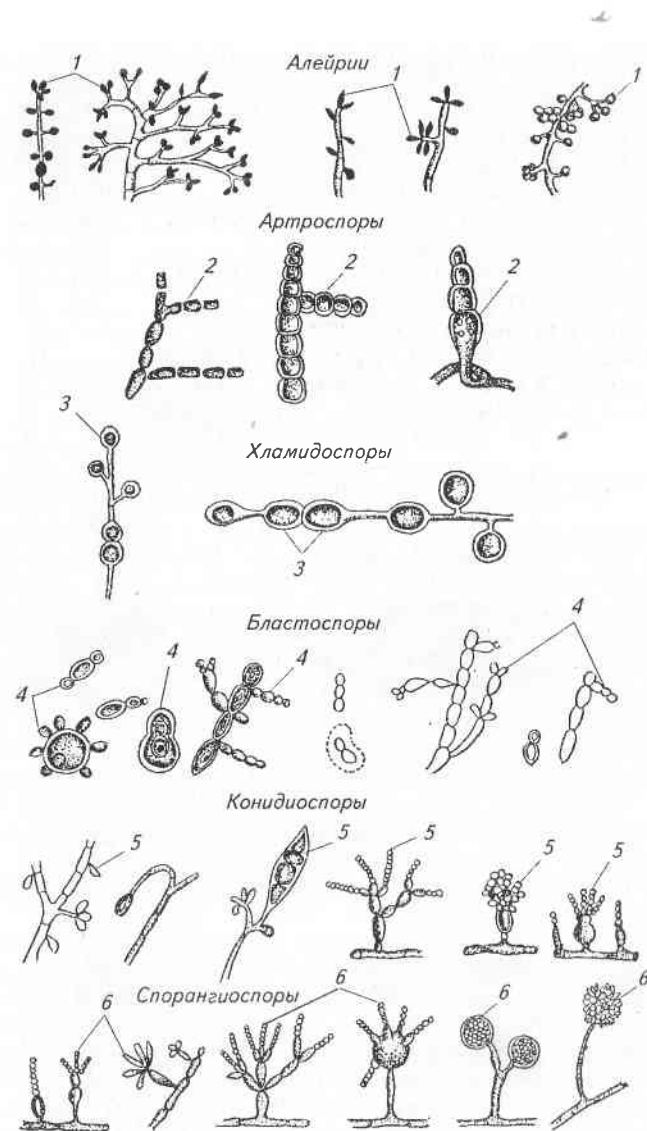


Рис. 21. Формы спорообразования у грибов:

1 — алейрии; 2 — артроспоры; 3 — хламидоспоры; 4 — бластоспоры; 5 — конидии различных типов; 6 — спорангиоспоры

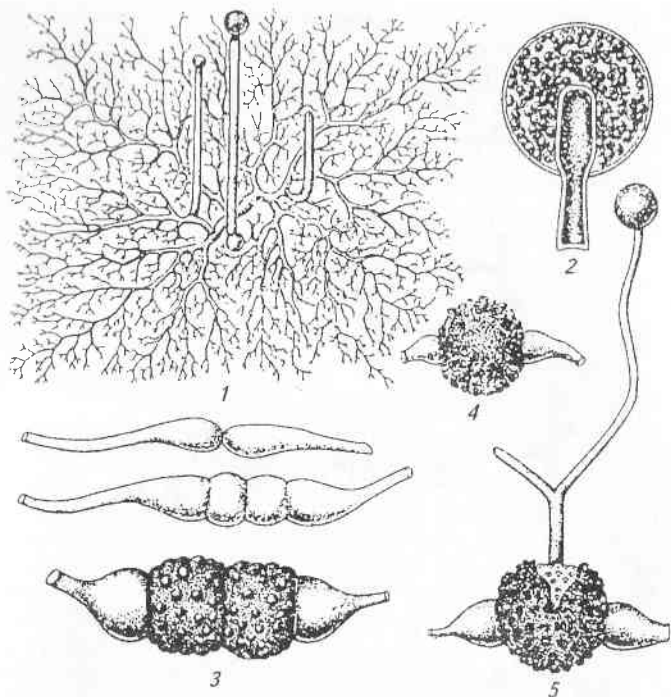


Рис. 22. Спорангии *Mucor racemosus*:

1 — мицелий со спорангиеносцами; 2 — спорангий; 3 — образование зигоспоры; 4 — зигоспора; 5 — прорастание зигоспоры

которые плесневые грибы; к базидиомицетам — шляпочные, головневые и др.

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

Особенности строения некоторых низших и высших грибов. К типичным представителям фикомицетов относят грибы рода *Mucor* (головчатая плесень). Размножаются фикомицеты половым путем, репродуктивным бесполом, а также оидиями и хламидоспорами. От несептированного мицелия отходят плодоносящие гифы спорангиеносцы (см. рис. 22) со спорангием, внутри которого развиваются эндоспоры — спорангиеспоры. При созревании спорангии разрываются и споры попадают в окружающую среду.

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

У грибов рода *Penicillium* (кистевидная плесень) мицелий и конидиеносцы септированы. Конидиеносцы ветвятся в верхней части один или несколько раз, образуя кисточки, на которых развиваются метелки с мутовками фиалид (метелки — цилиндрические клетки, мутовки — пучки или скопления клеток, фиалиды — конидиогенные клетки). От фиалид в виде цепочек отшнуровываются конидии (рис. 23).

Грибы рода *Aspergillus* (леечная плесень) характеризуются септированным мицелием и несептированными конидиеносцами с различной формы вздутиями на концах. На вздутиях расположены непосредственно фиалиды — носители цепочек конидий (головка одноярусная) или образуются метелки, на вершине которых развиваются пучки фиалид (головка двухъярусная). Головкой аспергилла называют вздутие конидиеносца с метелками, фиалидами и цепочками конидий (рис. 24).

У грибов рода *Fusarium* мицелий септирован, обычно окрашен в розовый, фиолетовый или другой цвет. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии. Макроконидии состоят из нескольких крупных клеток веретенообразной или серповидной формы. Микроконидии чаще одноклеточные, редко с одной-двумя перегородками (рис. 25). Vegetативное тело грибов рода *Fusarium* иногда образует хламидоспоры, склероции.

Дрожжи — представители класса *Ascomycetes* — одноклеточные организмы круглой или овальной формы с двухконтурной оболочкой и ядром. Размножение дрожжей происходит почкованием или делением; у некоторых видов — половым путем: споры полового размножения — аскоспоры развиваются эндогенно в сумках (асках).

Особенности микроскопического исследования грибов. Обычно грибы исследуют в неокрашенном состоянии. На предметное

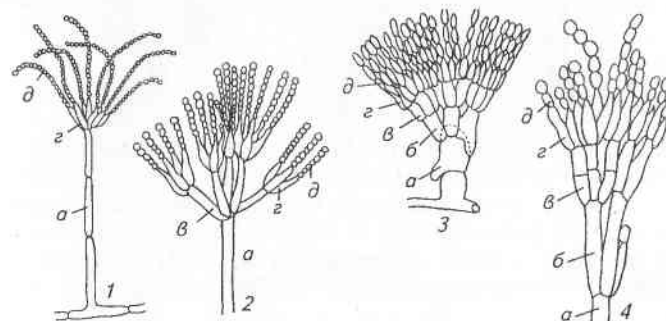


Рис. 23. Типы конидиеносцев у *Penicillium*:

1 — одноярусный; 2 — двухъярусный симметричный; 3 — многоярусный; 4 — несимметричный (a — ножка конидиеносца; б — веточки; в — метелки; z — фиалиды; д — конидии)

стекло наносят каплю жидкой смеси, состоящей из воды, этанола и глицерина в равных объемах. Флампированной иглой или микологическим крючком берут кусочек мицелия, помещают в каплю жидкости на предметное стекло, нити мицелия осторожно расправляют препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом $\times 40$ при затемненном

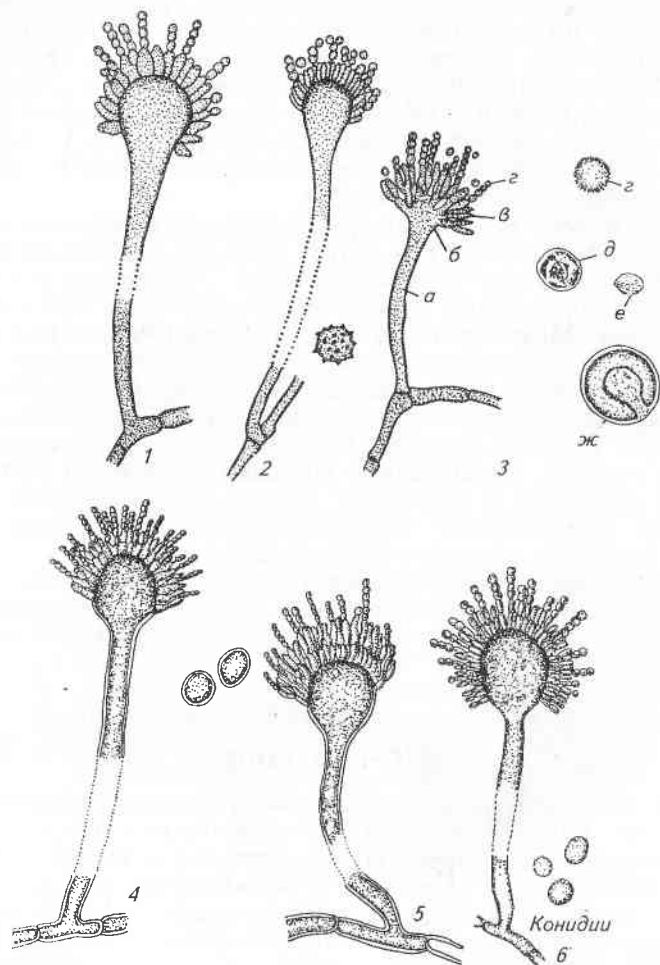


Рис. 24. Конидиеносцы и конидии видов рода *Aspergillus*:

1 — *A. flavus*; 2 — *A. fumigatus*; 3 — *A. nidulans*; 4 — *A. candidus*; 5 — *A. terreus*; 6 — *A. niger* (а — ножка конидиеносца; б — верхушечное вздутие; в — фиалиды; з — конидии; д — сумка; е — аскоспора; ж — клетка обертки клейстотеция)

поле зрения (опущен конденсор или уменьшен диаметр отверстия диафрагмы) или в иммерсионной системе. Использование воды для приготовления препарата приводит к разрушению цепочек спор. Большое количество изолированных спор в препарате часто мешает микроскопии. В таком случае часть жидкости удаляют, касаясь с одной стороны препарата кусочком фильтровальной бумаги, одновременно с другой стороны добавляя новую жидкость. Дрожжи микроскопируют аналогичным образом, а также готовят из них мазки, окрашенные простым способом.

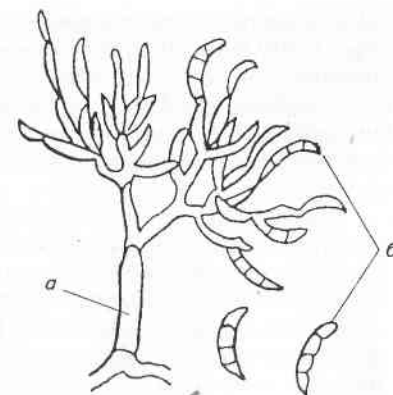


Рис. 25. Конидии рода *Fusarium*:

а — конидиеносец; б — конидии

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить препараты из культур грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и дрожжей.
2. Изучить под микроскопом строение мицелия, морфологию органов плодоношения и спор; зарисовать, обозначить структурные элементы.

Контрольные вопросы

1. Каковы характерные особенности микроскопических грибов?
2. В чем отличие высших от низших, совершенных от несовершенных грибов?
3. Чем характеризуются представители фикомицетов и микромицетов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Ascomycetes* (дрожжи)?

Тема 6 СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Цель занятия. Ознакомить студентов с назначением и основными методами стерилизации, применяемыми в микробиологии.

Оборудование и материалы. Автоклав, печь Пастера, аппарат Коха, керамические, асбестовые и мембранные фильтры, чашки Петри, бактериологические пробирки, колбы, мерные пипетки, стерилизатор, шприцы, иглы, пинцеты, вакуумный насос и др.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Методы стерилизации. Стерилизация (лат. *sterilis* — бесплодный) — обеспложивание; уничтожение в каком-либо материале

патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах. Для стерилизации используют физические и химические методы. Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

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

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

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

Стерилизация сухим нагретым воздухом. Метод применяют для стерилизации чистой стеклянной посуды. Для этого используют печь Пастера — специальный сушильный шкаф с двойными стенками. Снаружи он облицован теплонепроницаемым материалом. В его верхней части находится термометр. Между теплонепроницаемой обшивкой и внутренним металлическим корпусом на дне помещен автоматический электронагревательный элемент (рис. 26). При включении сушильного шкафа в электросеть воздух внутри него нагревается. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации. Режим

стерилизации: при температуре 155...160 °С — экспозиция 2 ч, при 165...170 °С — 1...1,5 ч, при 180 °С — 1 ч. По истечении времени стерилизации нагревание прекращают, и лишь когда температура снизится примерно до 45 °С, шкаф открывают.

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

Стерилизация влажным жаром также включает в себя ряд методов.

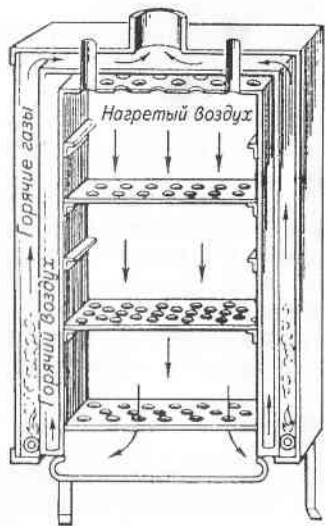


Рис. 26. Печь Пастера для сухой стерилизации

Кипячение. Общепринятый метод стерилизации металлических инструментов (шприцев, игл, пинцетов, ножниц, скальпелей и др.), некоторых резиновых и стеклянных предметов, которые складывают в стерилизаторы — специальные металлические ванночки с крышкой и вставной решеткой — подставкой. Эту подставку выстилают двумя-тремя слоями марли или тонким слоем гигроскопической ваты. Шприцы стерилизуют в разобранном виде, в иглы вставляют мандрены. Режущие инструменты — лезвия скальпелей, ножниц обертывают марлей или ватой. В стерилизатор наливают воду (лучше дистиллированную) так, чтобы она полностью покрывала инструменты, и добавляют 2%-й раствор гидрокарбоната натрия. Стерилизатор закрывают крышкой. Кипятят 20...30 мин. После стерилизации воду осторожно сливают, а инструменты используют только после их охлаждения.

Дистиллированную воду или приготовленный физраствор стерилизуют *ex tempore* на небольшом огне в колбе. Колбу закрывают ватной пробкой и помещают на асбестовую подставку.

Стерилизация текущим паром. Этим методом стерилизуют питательные среды и другие материалы и вещества (желатина, углеводы), которые разрушаются при нагревании их выше 100 °С. Способ дробной стерилизации при температурных режимах не выше 100 °С был разработан Тиндалем (1877). Однократное прогревание убивает только вегетативные формы микроорганизмов. Оставшиеся жизнеспособными споры бактерий в периоды между стерилизацией прорастают в вегетативные формы. Стерилизация на следующий день вызывает их гибель. На третий день прогревание гарантирует полное обеспложивание материала. Эффективность дробной стерилизации зависит от прорастания спор, а поэтому в промежутках между нагреванием материалы выдерживают при комнатной температуре (оптимум 25 °С). Для стерилизации используют текущепаровой аппарат Коха (рис. 27) — одностенный металлический котел цилиндрической формы с двойным дном и крышкой с отверстиями для термометра и выхода пара. Внутри котла расположена специальная подставка с отверстиями для стерилизуемого материала и нагревательные элементы. На дно аппарата наливают воду до уровня, о котором судят по показанию водомерной трубки. Началом стерилизации считают момент закипания воды. Образующийся пар устремляется вверх непрерывной струей, соприкасаясь с обрабатываемым материалом. Стерилизуют при 100 °С 30...40 мин три дня подряд. Дробную стерилизацию при 100 °С можно проводить в автоклаве, закрытом негерметично, при тех же режимах.

Тиндализация. Это дробная стерилизация при температурах ниже 100 °С, которую проводят в водяной бане (рис. 28). Кратность прогрева зависит от температуры: при 70...80 °С — 3 дня, 60...65 °С — 5 дней, 56...58 °С — 6...7 дней. В первый день матери-

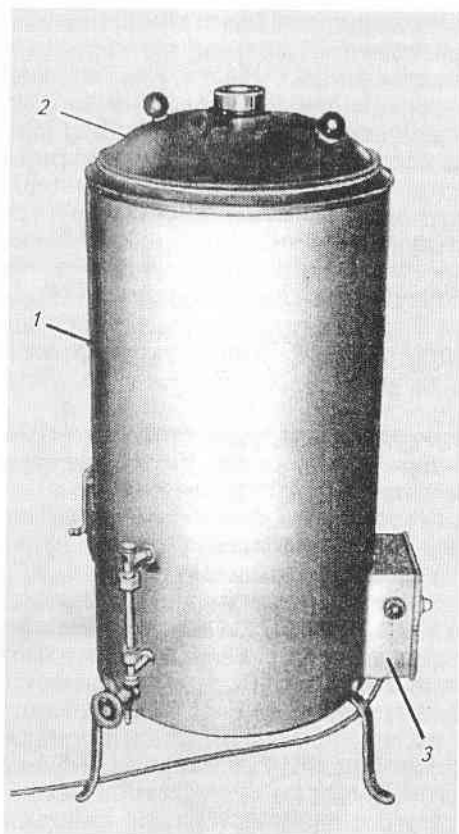


Рис. 27. Аппарат Коха:

1 — паровой котел; 2 — крышка; 3 —
электронагревательный блок

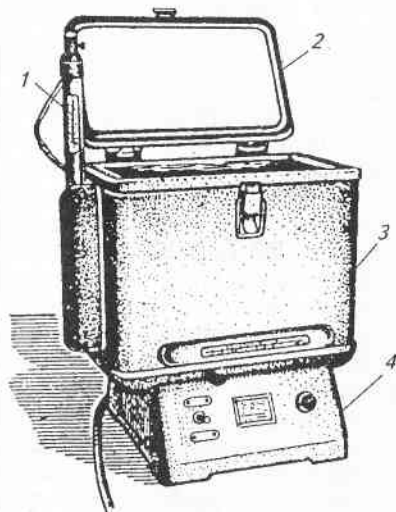


Рис. 28. Водяная баня:

1 — контактный термометр; 2 — крышка;
3 — емкость с водой; 4 — электронагре-
вательный блок

алы стерилизуют 2 ч, в последующие дни — 1 ч. В промежутках между прогреваниями стерилизуемый материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор. Коллоидные растворы, сыворотку крови, а также белоксодержащие вещества стерилизуют тиндализацией при 56...58 °С, так как они разрушаются при более высокой температуре.

Автоклавирование. Это стерилизация паром под давлением в сочетании с высокой температурой в специальном аппарате — автоклаве. При встрече насыщенного пара с более холодным объектом пар конденсируется, превращаясь в воду, в результате чего выделяется большое количество тепла. Кроме того, уменьшается объем пара, что способствует его проникновению во внутренние части стерилизуемого материала. Обязательное условие — поступление действительно насыщенного пара, чтобы его соприкосновение с холодным предметом вело к немедленной

конденсации и нагреванию. Промышленность выпускает автоклавы вертикальные и горизонтальные.

Вертикальный автоклав (рис. 29) — это двустенный металлический котел цилиндрической формы, закрываемый герметично крышкой. Между стенками через специальный кран с воронкой заливают воду до определенного уровня. Внутренняя стенка котла в верхней части снабжена отверстиями, в нижней части котла — краном, через который при нагревании воды пар вытесняет воздух из котла. Сверху на автоклав надевают металлический защитный каркас, причем между ним и самим автоклавом должно быть свободное пространство. Автоклав нагревают включением в электросеть.

Автоклав загружают стерилизуемым материалом, закрывают крышку и кран, через который заливали воду, нижний кран временно оставляют открытым. Нагреваемая вода между стенками автоклава кипит, образующийся пар поднимается вверх и через верхние отверстия внутренней стенки проходит внутрь котла,

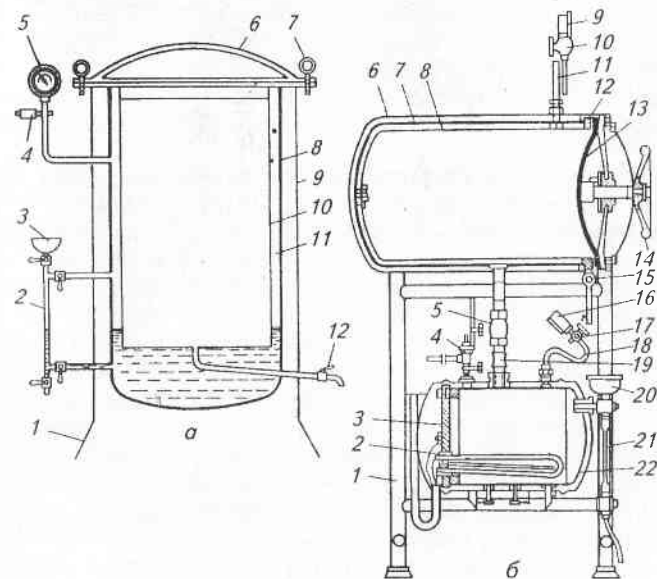


Рис. 29. Устройство автоклавов:

a — вертикальный автоклав: 1 — подставка; 2 — водомерная трубка; 3 — воронка; 4 — предохранительный клапан; 5 — манометр; 6 — крышка; 7 — винтовые зажимы; 8 — котел; 9 — кожух; 10 — камера стерилизации; 11 — водопаровая камера; 12 — паровыпускной клапан; *б* — горизонтальный автоклав: 1 — постамент; 2 — нагревательный элемент; 3 — крышка котла; 4 — предохранительный клапан; 5 — вентиль; 6 — кожух; 7 — паровая камера; 8 — стерилизационная камера; 9 — манометр паровой камеры; 10 — трехходовой кран; 11 — сифонная трубка паровой камеры; 12 — опорное кольцо; 13 — крышка паровой камеры; 14 — штуцер; 15 — впускной кран; 16 — манометр котелка; 17 — трехходовой кран котелка; 18 — сифонная трубка котелка; 19 — патрубок; 20 — воронка; 21 — водоуказательная колонка; 22 — котелок

толчками вытесняя воздух через нижний открытый кран. Когда воздух весь вытеснен и пар начинает выходить ровной струей, нижний кран закрывают. В результате давление пара внутри автоклава повышается. Началом стерилизации считают момент, когда давление достигает заданной величины (судят по показаниям манометра). Нагрев регулируют на протяжении всей стерилизации, поддерживая давление пара на одном уровне. При чрезмерном повышении давления внутри автоклава предусмотрен предохранительный клапан, через который избыток пара автоматически выходит наружу.

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

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

Автоклавированием стерилизуют питательные среды, выдерживающие нагревание выше 100°C (МПА, МПБ), а также физиологический раствор, стеклянную посуду, завернутую в бумагу, перевязочный материал и спецодежду, сложенные в металлические боксы; обеззараживают использованные бактериальные культуры. При обеззараживании режим работы автоклава 1,5 атм — 1 ч, при стерилизации чистого материала 0,5 атм — 30...40 мин. Температуру в автоклаве контролируют с помощью контактных термометров, а также химических веществ с различной точкой плавления: бензолафтол (110°C), бензойная кислота (120°C) и др. Эти вещества помещают в автоклав в пробирках (пастеровских пипетках) с добавлением краски (фуксин, метиленовая синь). Пробирки запаивают и устанавливают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. При определенной температуре вещество-индикатор плавится и приобретает цвет красителя.

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

Горизонтальный автоклав отличается от вертикального конструкцией, но принцип действия тот же.

Пастеризация. Этот метод предложил Пастер для сохранения питательной ценности пищевых продуктов (молоко, мясные, рыбные и овощные консервы), которая снижается при кипячении (разрушаются витамины и некоторые другие вещества). При пастеризации продукт нагревают до 80°C 30 мин, затем резко охлаждают (до $4...8^\circ\text{C}$). Крупные предприятия (молокозаводы) оснащены специальными пастеризаторами с охладительной системой. Пастеризация снижает количество бактерий: погибают вегетативные формы, а споры сохраняются. Резкое охлаждение и последующее хранение при низкой температуре ($4...5^\circ\text{C}$) препятствуют прорастанию спор и последующему размножению бактерий.

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

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

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

Асбестовые фильтры (Зейтца) — плотные пластины, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. Отечественные асбестовые фильтры обозначают марками Φ_2 и СФ. К стерилизующим относят фильтры марки СФ.

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

Большей частью в работе используют фильтры Зейтца и мембранные фильтры. Фильтры монтируют в специальный держатель-воронку, который вставляют в пробку колбы Бунзена (толстостенная колба с тубусом). Смонтированный фильтр обертывают бумагой и стерилизуют в автоклаве. Фильтруемую жидкость наливают в воронку над фильтром, на тубус колбы надевают резиновую трубку (шланг), присоединенную к ручному или электрическому насосу, выкачиванием воздуха из колбы создают пониженное давление и фильтруют жидкость (рис. 30). Бактерии

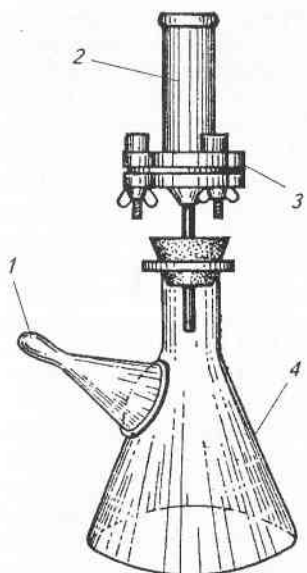


Рис. 30. Смонтированный фильтр Зейтца:

1 — отводная трубка колбы к вакуумному насосу; 2 — держатель фильтра; 3 — фильтр; 4 — колба Бунзена

остаются на фильтре. Стерильность полученных фильтратов проверяют посевом на питательные среды с последующим инкубированием в термостате в течение нескольких дней.

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами — метод, применяемый для обеззараживания воздуха в помещении (боксах, операционных). В лаборатории источником УФ-лучей обычно служат специальные бактерицидные лампы. Бактерицидные лампы также нашли применение в пищевой промышленности при хранении различных про-

дуктов (температура выше 0 °С).

Стерилизация ультразвуком — метод, который используют для обеззараживания воды, молока, некоторых продуктов, а также кожевенного сырья. Стерилизующее действие ультразвука связано с возникновением в цитоплазме бактерий кавитационных пузырьков, заполненных парами под давлением около 10 тыс. атм, вследствие чего разрушаются внутренние структуры бактериальной клетки.

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

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

Подготовка посуды для стерилизации. Лабораторная посуда должна быть чисто вымытой и простерилизованной. Для мытья используют растворы мыла или химические моющие средства. Новую посуду предварительно кипятят в 1...2%-м растворе соля-

ной кислоты, чтобы избежать последующего выщелачивания стекла. Вымытую в проточной воде посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Бактериологические пробирки, конические, матровые колбы (рис. 31) закрывают ватно-марлевыми пробками, состоящими из плотно скрученных валиков ваты, покрытых слоем марли. Для бактериологических пробирок также разработаны металлические пробки в виде наружных колпачков. Следует учитывать, что стерилизация ватных пробок при высокой температуре приводит к выделению из ваты веществ, ингибирующих рост некоторых чувствительных бактерий, например бруцелл.

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

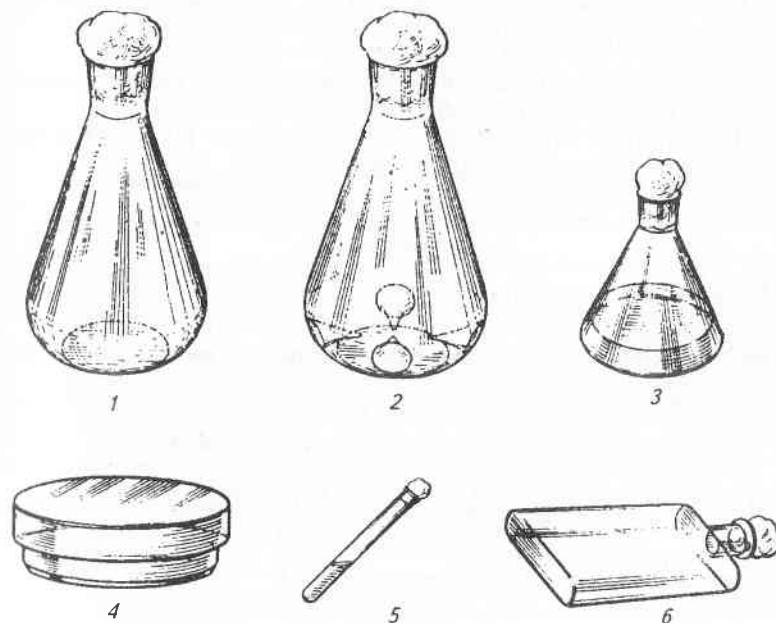


Рис. 31. Посуда для культивирования микроорганизмов:

1 — калачная колба; 2 — калачная колба с отбойниками; 3 — коническая колба; 4 — чашка Петри; 5 — пробирка; 6 — матровая колба (матрац)

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

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

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

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с работой автоклава, печи Пастера, аппарата Коха. Определить достоинства и недостатки каждого метода стерилизации.
2. Смонтировать фильтр Зейтца и простерилизовать жидкость (сыворотку крови) фильтрованием.
3. Подготовить стеклянную посуду (чашки Петри, колбы и т. д.) и питательные среды для стерилизации.

Контрольные вопросы

1. Что такое стерилизация, какие требования к ней предъявляют?
2. Каковы основные методы стерилизации, какие методы применяют в своей практической работе врачи?
3. Каковы устройство и назначение автоклава? Как контролируют качество его работы?
4. На чем основан метод стерилизации текучим паром? Чем обусловлено его применение?
5. Чем обусловлено применение методов дробной стерилизации?
6. Каковы устройство и назначение сушильного шкафа? Какие материалы и при каких температурных режимах стерилизуют сухим жаром?
7. На чем основан метод стерилизации фильтрованием? Какие бактериологические фильтры применяют для стерилизации? Как фильтруют жидкости и как проверяют результаты фильтрования?
8. В чем отличие стерилизации от дезинфекции?

Тема 7

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Ознакомить студентов с типами питательных сред, методами их конструирования и культивированием микроорганизмов.

Оборудование и материалы. Агар-агар, пептон, желатина, мясная вода, перевар Хоттингера, МПА, МПБ, среды Китта—Тароцци, Эндо, Левина, Вильсон—Блера, Гисса, сухие питательные среды, кровяной МПА, потенциометр, индикаторные бумажки, стерильная дефибрированная кровь барана, термостат, анаэростат.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

К любой питательной среде предъявляют ряд основных требований: 1) стерильность и по возможности прозрачность; 2) содержание необходимых для жизнедеятельности клеток биохимических факторов — источников энергии, углерода, азота, серы, а также неорганических ионов — обязательно в форме, доступной для усвоения микроорганизмами; 3) оптимальные значения ряда биофизических показателей: концентрации водородных ионов (рН), окислительно-восстановительного потенциала (Еh), активности воды (a_w), осмотического давления.

Концентрация водородных ионов (рН). Микроорганизмы способны существовать в строго определенных границах кислотности питательной среды. В зависимости от кислотного оптимума бактерии подразделяют на нейтрофилы, алкалофилы и ацидофилы.

Вода слабо диссоциирует, поэтому концентрация ионов водорода H^+ (реально существуют ионы $H_3O_4^+$ — гидратированная форма иона гидроксония H_3O^+) и гидроксид-ионов OH^- в чистой воде при 25 °С составляет 10^{-7} моль/г. Преобладание в растворе водородных ионов определяет его кислую реакцию, гидроксильных — щелочную, при равной концентрации ионов H^+ и OH^- раствор нейтрален. Произведение концентраций водородных и гидроксильных ионов в конкретном растворе всегда равно постоянной величине (константе), которую называют ионным произведением воды: $K = (H^+)(OH^-) = 10^{-14}$. Следовательно, чтобы судить о реакции среды, достаточно определить концентрацию только одного из указанных ионов. Обычно определяют концентрацию ионов водорода. Вместо концентрации ионов водорода указывают ее десятичный логарифм, взятый с обратным знаком, называют эту величину водородным показателем и обозначают символом $pH = -lg (H^+)$. Измеряют рН питательных сред потенциометрическим (электрометрическим) или колориметрическим способами.

Последовательность операций при определении рН на иономере И-130 приведена далее. (Показания стеклянного электрода предварительно калибруют по буферам с точно известными значениями рН.)

1. Прибор включают в сеть и прогревают в течение 30 мин.
2. Так как температура раствора влияет на результат определения рН, на штативе устанавливают термометр или автоматический термокомпенсатор. Переключа-

тель рода термокомпенсации на передней панели переводят в соответствующее положение.

3. Стаканчик предварительно ополаскивают анализируемым раствором, электроды промывают дистиллированной водой и также ополаскивают анализируемым раствором, подсушивают фильтровальной бумагой.

4. Анализируемый раствор наливают в стаканчик, в который погружают электроды. Время снятия показаний не более 3 мин.

5. После окончания измерений электроды промывают дистиллированной водой и погружают в стаканчик с дистиллированной водой.

При колориметрическом определении используют индикаторы. Все индикаторы представляют собой слабые кислоты или основания, и их диссоциация в растворе зависит от концентрации водородных ионов. Недиссоциированная молекула индикатора и его ионы разного цвета. Внося индикатор в раствор с неизвестной концентрацией водородных ионов, сопоставляют его цвет в исследуемом растворе с цветом раствора с известным значением pH. Грубую оценку pH ($\pm 0,2$) проводят с помощью бумажных индикаторов, к которым приложена цветовая шкала: каждая цветная полоса на бумажной карточке соответствует определенному значению pH. Универсальный индикатор изменяет окраску в диапазоне pH от 2 до 10.

Большинство бактерий растут в питательных средах со слабощелочными значениями pH (6,8...7,6), грибы — в кислых средах (pH 3,0...6,0). pH среды доводят до нужного значения добавлением слабых растворов щелочи, 10%-го раствора соды или кислоты. Например, надо приготовить 1000 мл МПБ с pH 7,4. При стерилизации сред pH обычно снижается приблизительно на 0,2, поэтому перед стерилизацией pH среды доводят до 7,6. Для этого к 40 мл МПБ с исходным значением pH добавляем 4 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Следовательно, на 1000 мл МПБ необходимо добавить в 25 раз больше раствора щелочи (100 мл).

В процессе роста микроорганизмов на питательных средах кислотность достаточно быстро может выйти за пределы оптимальной. Чтобы поддержать необходимое значение pH, в среды нередко добавляют фосфатные буферные смеси. При выращивании микроорганизмов в реакторах pH среды корректируют периодическим добавлением раствора щелочи или кислоты.

Окислительно-восстановительный потенциал (ОКВП, Eh). Рост микроорганизмов тесно связан с окислительно-восстановительными условиями питательной среды, которые влияют на работу окислительно-восстановительных систем микробных клеток. ОКВП принято отсчитывать относительно окислительно-восстановительного потенциала водорода $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$. Стандартное значение потенциала этой реакции при pH 7,0 (E_0) составляет -420 мВ. Большое отрицательное значение стандартного ОКВП водорода характеризует его высокую восстановительную способность, т. е. способность отдавать электроны. Стандартный ОКВП системы $H_2O \rightleftharpoons 1/2O_2 + 2H^+ + 2e^-$ равен 820 мВ. Большое положительное значение потенциала в данном случае объясняет низкую способность воды отдавать электроны и одновременно высокую способность молекулярного кислорода акцептировать электроны. ОКВП можно измерять электрометрическим способом. В этом случае используют электрод измерения и электрод сравнения, потенциал последнего по отношению к стандартному водородному электроду известен. ОКВП системы по отношению к водороду обозначают как Eh. Измеряют Eh питательной среды, например, при помощи иономера И-130.

1. Прибор включают в сеть и прогревают 30 мин.

2. Переключатель рода работ переводят в положение «V».

3. Погружают электроды в стакан с раствором, при этом следят, чтобы электрод сравнения был установлен на несколько миллиметров ниже измерительного.

4. После установления показаний их снимают в мВ.

Для корректировки ОКВП питательных сред в них добавляют различные вещества (см. «Культивирование анаэробных бактерий» в данной теме).

В питательных средах повышение ОКВП в основном связано со степенью насыщения кислородом. Аэробы хорошо растут при высоких положительных значениях Eh, рост большинства анаэробов прекращается при Eh, выше -100 мВ, а строгих анаэробов — при Eh превышающем -330 мВ.

О значении Eh также можно судить по цвету окислительно-восстановительных красителей, которые окрашены в окисленном состоянии и бесцветны в восстановленном. Различные красители восстанавливаются при разных значениях Eh, поэтому подбором красителей можно контролировать ОКВП питательных сред. Значение Eh, при котором краситель окислен или восстановлен на 50 % при pH 7,0, называют стандартным ОКВП (E_0). Например, для метиленового синего E_0 составляет 11 мВ, резорурфина — 51 мВ, феносафранина — 252 мВ.

Активность воды и осмотическое давление. Микроорганизмы поглощают питательные вещества в виде растворов, поэтому вода — абсолютно необходимый компонент любой среды. Минимальная предельная влажность питательной среды для роста бактерий составляет 20...30 %, грибов — 15 %. Однако вода в питательной среде частично связана с растворенными в ней веществами и поэтому недоступна для микроорганизмов. Содержание воды в доступной для микробов форме выражают показателем активности воды (a_w), которую определяют как отношение давления водяного пара над питательной средой (раствором) к давлению паров над чистой водой (P/P_0). У дистиллированной воды $a_w = 1,0$. Бактерии растут в средах с $a_w = 0,95...0,99$. Активность воды в среде можно определить по формуле $a_w = A/100$, где A — относительная влажность (%) атмосферы, которую измеряют при равновесии в закрытом сосуде, содержащем питательную среду.

Существенное отклонение осмотического давления питательной среды от оптимального тормозит рост бактерий. Именно по этой причине соль и сахар в высоких концентрациях используют для консервирования пищевых продуктов. Среди безвредных бактерий только некоторые виды способны расти при повышенных концентрациях хлорида натрия в питательной среде (стафилококки, листерии). Наиболее доступный способ достижения оптимальных значений осмотического давления и активности воды в бактериологических питательных средах — это добавление в них хлорида натрия (0,5 %) или некоторых других солей.

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

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

Среды неопределенного химического состава. Их подразделяют на: 1) среды животного происхождения (исходные продукты — мясо, рыба, яйца, молоко и т. д.); 2) среды растительного происхождения (исходные продукты — соя, горох, картофель, морковь и т. д.).

Некоторые продукты используют в натуральном виде (картофель, морковь, молоко и т. д.), но чаще животные и растительные ткани подвергают различной обработке (экстрагированию, ферментативному или кислотному гидролизу).

Среды известного химического состава (синтетические). В них входят известные химические соединения (соли, углеводы, аминокислоты, витамины и т. д.) в оптимальном количественном соотношении. Синтетические питательные среды используют, когда выращиваемую клеточную массу необходимо максимально освободить от балластных органических соединений, входящих в состав обычных сред, например при получении диагностических аллелергенов или при изучении метаболических потребностей микроорганизма в том или ином конкретном химическом соединении.

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

Жидкие питательные среды. Готовят, используя экстракты, гидролизаты, растворы исходных продуктов.

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

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

Желатина — экстракт из тканей, содержащих много коллагена (кости, хрящи, сухожилия и т. д.). Желатиновый гель плавится при 25 °С, что делает его неудобным для выращивания микроорганизмов с температурным оптимумом 37...38 °С. Кроме того, ряд бактерий выделяют протеолитические ферменты, разлагающие желатину. Обычно в питательные среды вносят 10...20 % желатины.

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

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

В качестве исходных компонентов для приготовления основных сред используют наиболее часто мясную воду, перевар Хоттингера, растительные гидролизаты.

Мясная вода: говядину освобождают от костей, жира, сухожилий, пропускают через мясорубку. Мясной фарш заливают водопроводной водой в соотношении 1 : 2, кипятят 1 ч. После кипячения мясную воду охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем доливают водопроводной водой до первоначального объема, разливают по емкостям, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 120 °С 20 мин.

Перевар Хоттингера готовят из мясных отходов путем их триптического гидролиза. Жир, фасции, сухожилия мелко нарезают, заливают кипящей водой в соотношении 1 : 2, кипятят, охлаждают до 45 °С и добавляют панкреатин, подщелачивают раствором карбоната натрия до pH 7,8...8,0, встряхивают и добавляют хлороформ (10 мл/л), плотно закрывают, выдерживают в теплом месте 10 дней, получают продукт гидролиза (перевар).

Мясо-пептонный бульон (МПБ). К 1 л мясной воды добавляют 1 % пептона* и 0,5 % хлорида натрия, устанавли-

* Пептон — промежуточный продукт распада белков, состоящий из полипептидов и аминокислот; готовят из сычужков крупного рогатого скота и желудков свиней; выпускают в виде порошка, хорошо растворимого в воде.

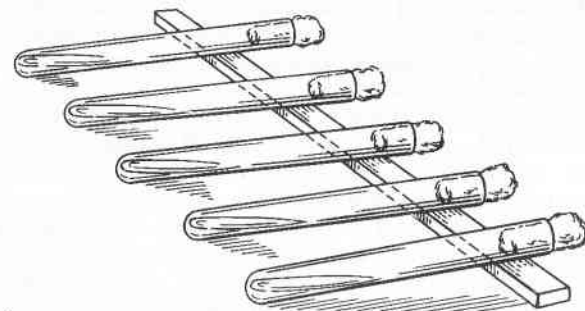


Рис. 32. Приготовление скошенного агара

вают необходимый pH дробным добавлением 10%-го раствора гидроксида натрия или гидроксида калия. Фильтруют через бумажный фильтр, разливают по колбам, пробиркам и стерилизуют при 120 °С 15...20 мин.

Мясо-пептонный агар (МПА): к МПБ добавляют 2...3 % промытого мелко нарезанного агар-агара, нагревают до расплавления агара, доводят до кипения, в горячем виде проверяют pH, затем, если необходимо, доводят его до нужного значения (7,2...7,6), фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Профильтрованный горячий агар разливают по пробиркам и колбам, стерилизуют автоклавированием при 1 атм 20...30 мин. Чтобы получить скошенную поверхность агара, удобную для посева, после стерилизации пробирки с расплавленным МПА оставляют при комнатной температуре до уплотнения в наклонном положении (конец с пробкой приподнят) (рис. 32).

Широко используют культивирование микроорганизмов на плотных питательных средах в чашках Петри. Диаметр стандартной чашки Петри (рис. 33) около 10 см, выпускают чашки меньшего и большего диаметров, а также одноразовые пластиковые. В

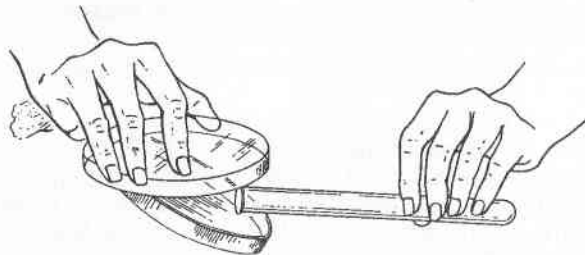


Рис. 33. Разливка агара в чашки Петри

стандартные стерильные чашки Петри над пламенем горелки наливают около 20 мл расплавленного и охлажденного до 45...50 °С питательного агара, чашки помещают на горизонтальную поверхность до застывания агара.

Полужидкий мясо-пептонный агар (ПЖА) готовят, как МПА, но добавляют 0,25 % агара. Кипятят при помешивании до полного расплавления агара, устанавливают рН 7,2...7,6, фильтруют в горячем виде, стерилизуют в автоклаве.

Мясо-пептонная желатина (МПЖ): к МПБ добавляют 10...20 % измельченной желатины, нагревают до расплавления уплотнителя, устанавливают рН 7,2...7,4, кипятят, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по пробиркам и стерилизуют дробно в аппарате Коха три дня по 20 мин или однократно в автоклаве при 112 °С 15 мин.

Бульон Хоттингера: основной перевар Хоттингера разводят водопроводной водой в соотношении 1:5 (1:8) до содержания аминного азота 120 мг%, добавляют 0,5 % хлорида натрия, 0,1 г гидрофосфата калия, устанавливают рН 7,4...7,6, кипятят 15...20 мин, фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр, разливают по емкостям и стерилизуют при 120 °С 20...30 мин.

Агар Хоттингера готовят, добавляя к бульону Хоттингера 2 % агар-агара.

Предприятия биологической промышленности выпускают готовые питательные бульон и агар в виде сухого порошка.

Питательный бульон содержит (г/л): триптический гидролизат кильки — 10,05, хлорид натрия — 4,95. Навеску порошка массой 15 г растворяют в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по емкостям и стерилизуют в автоклаве при 120 °С 20 мин (рН 7,3).

Питательный агар содержит (г/л): ферментативный гидролизат кормовых дрожжей — 12,0; агар — 12,5; хлорид натрия — 5,5. Навеску порошка массой 36 г растворяют в 1 л дистиллированной воды, кипятят 3 мин, фильтруют через ватный фильтр, стерилизуют при 120 °С 20 мин (рН 7,3).

Обогащенные среды. Многие виды болезнетворных бактерий плохо растут на общеупотребительных питательных средах, поэтому в основные среды добавляют кровь, сыворотку крови, углеводы и т. д. Такие питательные среды получили название обогащенных.

Сывороточный и кровяной агары: к расплавленному и охлажденному до 45...50 °С стерильному питательному агару добавляют 5...10 % стерильной дефибринированной крови барана (кролика) или сыворотки крови (лошади, крупного рогатого скота, кролика). Для получения дефибринированной крови у барана кровь берут асептично из яремной вены стерильной иглой в стерильный флакон (или колбочку) со стек-

лянными (фарфоровыми) бусами или шариками, встряхивают вращательными движениями 15...20 мин, чтобы предотвратить свертывание крови. Фибрин остается на бусах.

Компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри, пробирки и оставляют до застывания питательной среды.

Сывороточный и кровяной бульоны готовят аналогичным образом.

Растворы углеводов (глюкоза и др.) стерилизуют текучим паром или фильтрованием и добавляют в количестве 0,5...1 % к питательной среде.

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

Среда Мак-Коя: чистые куриные яйца обрабатывают спиртом, быстро проводят через пламя горелки. Стерильно вскрывают, желтки отделяют от белков. К 60 частям желтков добавляют 40 частей физиологического раствора (рН 7,0...7,2). Компоненты перемешивают, разливают в пробирки по 4...5 мл и помещают в наклонном положении в аппарат для свертывания сыворотки. Стерилизуют в первый день при 75 °С 1 ч, на второй день при 85 °С 30 мин. Для контроля стерильности приготовленные среды выдерживают 2 сут в термостате при 37...38 °С.

Среда Терских состоит из фосфатной смеси Зеренсена и кроличьей сыворотки. Смесь Зеренсена: раствор А: гидрофосфат натрия — 11,876 г, вода дистиллированная — 1000 мл; раствор Б: дигидрофосфат калия — 9,078 г, вода дистиллированная — 1000 мл. К 90 мл раствора А добавляют 10 мл раствора Б и доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл. Раствор разливают в пробирки по 5 мл, стерилизуют при 1,5 атм 20 мин. В каждую пробирку добавляют шесть—восемь капель стерильной инактивированной при 56 °С сыворотки кролика.

Элективные среды (лат. *electus* — избранный). Это питательные среды для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида из материалов, содержащих несколько видов микробов. Элективные среды чрезвычайно многообразны по своему составу. В них включают компоненты, обеспечивающие преимущественный рост искомого микроорганизма и (или) подавляющие в той или иной степени рост сопутствующей микрофлоры. По консистенции среды данного типа могут быть плотными и жидкими. Жидкие элективные среды называют средами обогащения или накопления, их применяют, когда ставят цель увеличить количество искомого микроорганизма в смешанной популяции.

Молочно-солевой агар предназначен для избирательного культивирования стафилококков. К расплавленному

МПА с рН 7,2...7,4, содержащему 5...7,5 % хлорида натрия, добавляют 10 % стерильного обезжиренного молока, перемешивают и разливают в чашки Петри.

Среда Шустовой предназначена для выделения сальмонелл. Представляет собой МПА (рН 7,4) с добавлением 10 % к объему среды 50%-го водного раствора тиосульфата натрия и 2 % раствора Люголя.

Среда Раппопорт предназначена для культивирования сальмонелл. К МПБ добавляют 1 % глюкозы, 10 % желчи, 1 % индикатора Андрэдэ. Стерилизуют текучим паром.

Среда Мюллера предназначена для культивирования сальмонелл. В колбу с 4,5 г стерильного мела наливают 90 мл МПБ, стерилизуют в автоклаве при 120 °С 30 мин. Затем стерильно добавляют 2 мл раствора Люголя и 10 мл раствора тиосульфата натрия (тиосульфат натрия — 50 г, дистиллированная вода — 100 мл), стерилизуют в аппарате Коха 30 мин.

Среда Кауфмана — это среда обогащения для сальмонелл. К 100 мл среды Мюллера добавляют 1 мл водного раствора бриллиантового зеленого, разведенного 1 : 1000, и 5 мл стерильной бычьей желчи. Смесь стерилизуют текучим паром 30 мин.

Казеиново-угольный агар (КУА) с пенициллином используют для культивирования бордетелл. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют гидролизат казеина — 20 мл, хлорид натрия — 5 г, хлорид калия — 0,2 г, хлорид кальция — 0,002 г, карбонат натрия — 0,4 г, хлорид магния — 0,025 г, гидрофосфат калия — 0,24 г, растворимый крахмал — 1 г, цистин — 0,01 г, агар — 20 г. Компоненты растворяют, устанавливают рН 7,2, стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Перед употреблением в расплавленный агар (50 °С) добавляют 3 % дрожжевого экстракта и 0,2 % сухого активированного угля и 0,5 ЕД/мл пеницилина. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри.

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

К питательным средам такого типа относят среды Гисса, Эндо, Плоскирева, Левина и др.

Среды Гисса используют для изучения ферментативных свойств выделенных культур микроорганизмов. К 100 мл дистиллированной воды добавляют 1 % пептона, 0,5 г хлорида натрия. Компоненты растворяют, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,0...7,4, добавляют один из углеводов-субстратов (лактоза, глюкоза и т. д.), агар-агар (0,3...0,4 %), а затем 1 мл индикатора Андрэдэ или 0,1 мл 1,6%-го раствора

бромтимолового синего. Готовую среду разливают по 3 мл в пробирки, стерилизуют текучим паром три дня подряд по 30 мин или при 112 °С 20 мин.

Выпускают сухие среды Гисса с индикатором ВР — смесь водно-голубого с розоловой кислотой (готовые среды — полужидкой консистенции).

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

Среда Эндо содержит лактозу в качестве субстрата и предназначена для дифференциации бактерий, различающихся по способности расщеплять лактозу.

К 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,4) температурой 70 °С добавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в небольшом количестве дистиллированной кипяченой воды. В отдельных пробирках готовят: 2...3 мл спиртового раствора основного фуксина; 10 мл 10%-го водного раствора сульфата натрия.

В стерильную пробирку вносят 1 мл раствора фуксина и добавляют раствор сульфита натрия до обесцвечивания фуксина. Приготовленную смесь вливают в расплавленный агар, перемешивают и разливают по чашкам Петри. Готовая среда бесцветна, при росте на ней микроорганизмов, расщепляющих лактозу, среда закисляется, обесцвеченный фуксин восстанавливается, и колония микроорганизма, например эшерихий, приобретает красный цвет с металлическим оттенком. Среду готовят за сутки до ее использования. Выпускают также сухую среду Эндо. Перед употреблением определенную навеску порошка вносят в дистиллированную воду, кипятят и разливают по чашкам Петри.

Среда Левина аналогична по целевому назначению среде Эндо, но содержит другой индикатор (эозин с метиленовым синим). К 100 мл расплавленного МПА (рН 7,2...7,4) добавляют 2 мл 0,5%-го водного раствора метиленового синего, 1,5 мл 2%-го раствора эозина желтого, 2 г лактозы, 0,2 г дигидрофосфата калия. Растворы красителей готовят на дистиллированной воде, стерилизуют текучим паром 60 мин. Лактозу и дигидрофосфат калия предварительно разводят в небольшом количестве стерильной дистиллированной воды и кипятят. Колонии лактозопозитивных бактерий на этой среде окрашены в фиолетово-черный цвет.

Агар Плоскирева предназначен для выделения сальмонелл, содержит лактозу в качестве субстрата и компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Среду выпускают в виде порошка, в ее состав кроме питательной агаровой основы входят: желчные соли, цитрат натрия, тиосульфат натрия, фосфат натрия, бриллиантовый зеленый, кальцинированная сода, йод, хлорид натрия, лактоза, нейтральный красный. Навес-

ку порошка растворяют в воде, кипятят и разливают в чашки Петри. Готовая среда прозрачная или розоватая. Колонии сальмонелл бесцветные, эшерихий — брусничного цвета.

Методы культивирования микроорганизмов. Наряду с общими принципами культивирования микроорганизмов различных физиологических групп имеет некоторые особенности.

Культивирование аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Плотные, жидкие или полужидкие питательные среды, засеянные чистыми культурами микроорганизмов или исследуемым материалом, помещают в термостаты (рис. 34), поддерживающие оптимальную для данного микроорганизма температуру. При температурах, превышающих верхнюю границу нормы, бактерии не только замедляют рост, но и быстро гибнут. При температуре ниже оптимальной скорость роста микроорганизма постепенно замедляется.

У мезофилов температурный оптимум находится в интервале 30...37 °С, у психрофилов — 10...15 °С, у термофилов — 50...60 °С.

Микроорганизмы в процессе культивирования на питательных средах при условии, что в среды не вносят дополнительные вещества, постепенно замедляют и затем прекращают свой рост из-за истощения питательного субстрата, изменения оптимальных значений биофизических показателей (рН, Eh и т. д.). Такое

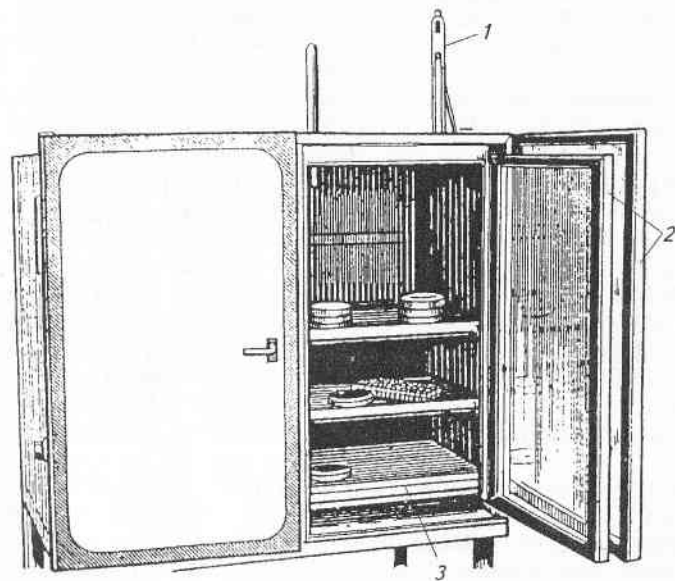
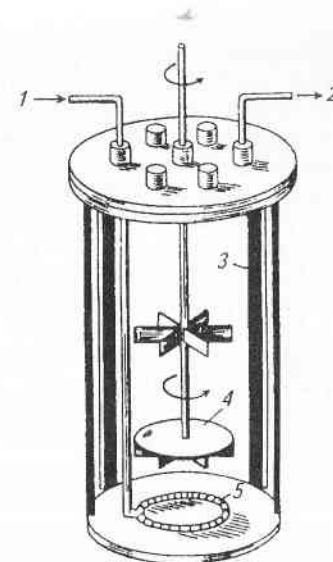


Рис. 34. Термостат:

1 — контактный термометр; 2 — дверцы термостата; 3 — полки

Рис. 35. Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов:

1 — вход воздуха; 2 — выход воздуха; 3 — отбойники; 4 — мешалка; 5 — барботер



культивирование микроорганизмов называют *периодическим*. Если при этом жидкую питательную среду в процессе инкубирования посевов не перемешивают, то такой способ культивирования определяют как *стационарный*. При диагностических бактериологических исследованиях обычно используют именно такой способ культивирования. В биологической промышленности при производстве вакцин и других биопрепаратов, когда необходимо достичь максимального выхода бактериальной массы или экзотоксинов, применяют периодическое культивирование в жидких средах с их интенсивным перемешиванием.

При таких задачах аэробные бактерии культивируют в колбах, бутылях на шюттель-аппаратах с частотой колебания 150...250 мин⁻¹, что облегчает передачу бактериям кислорода и питательных компонентов.

Наиболее эффективное культивирование бактерий в жидких питательных средах с максимальным выходом биопродукта достигают в ферментерах. Ферментеры (реакторы) представляют собой металлические или стеклянные культуральные сосуды емкостью от 500 мл до 1000 л (рис. 35). При культивировании бактерий в ферментерах среду перемешивают специальными мешалками с одновременной подачей необходимого количества стерильного воздуха. Ферментеры конструируют как автономные системы с автоматической регуляцией температуры и рН среды. В ферментерах также осуществляют *непрерывное (проточное)* культивирование, при котором в отличие от периодической культуры автоматически в среду подаются свежие питательные компоненты со скоростью, равной удалению аналогичного объема выросшей культуры бактерий. Такое непрерывное культивирование в хорошо отрегулированной системе в принципе можно продолжать неограниченно долго.

Культивирование анаэробных бактерий. облигатные анаэробы — бактерии, у которых энергетический и конструктивный метаболизм происходит без молекулярного кислорода O₂. У таких микроорганизмов в процессе дыхания конечными акцепторами

электронов являются окись углерода (IV), ионы сульфата, фумарат и др. Кроме того, молекулярный кислород действует на многие анаэробы губительно. Например, строгие анаэробы погибают при незначительных концентрациях кислорода (бактероиды, фузобактерии), умеренные анаэробы менее чувствительны (*C. perfringens*), аэротолерантные анаэробы могут расти в условиях обычной атмосферы (молочнокислые бактерии). Большинство болезнетворных анаэробов относят к строгим или умеренным анаэробам. Для их культивирования используют специальные питательные среды и газовые смеси. Последними наполняют анаэроостаты.

Необходимое условие роста облигатных анаэробов — не столько отсутствие молекулярного кислорода, сколько низкий ОКВП питательных сред. Резко восстановительных условий достигают, добавляя в среды редуцирующие (восстанавливающие) вещества и одновременно удаляя из них молекулярный кислород. В качестве редуцирующих веществ в питательные среды добавляют химические соединения, приведенные в таблице 1.

1. Восстанавливающие вещества для культивирования анаэробов

| Восстановитель | E_0 , мВ | Содержание восстановителя в среде, % |
|----------------------------------|------------|--------------------------------------|
| Тиогликолят натрия | < -100 | 0,05 |
| Хлорид цистеина | -210 | 0,025 |
| Дитиотрейтол | -330 | 0,05 |
| Цитрат титана (III) | -480 | 0,5...2 мМ |
| Хлорид цистеина + сульфид натрия | -571 | 0,025 + 0,025 % |

С этой же целью в питательные среды вносят вареные кусочки печени, мышц, мозга, кровяные сгустки, куриный яичный белок, зерна ржи. Считают, что в этих тканях сильное редуцирующее действие оказывают вещества, богатые SH-группами.

Для создания условий анаэробии питательные среды максимально освобождают от кислорода путем кипячения, а также пропуская через жидкие среды инертные газы или насливая на поверхность питательной среды вазелиновое масло для предотвращения контакта с кислородом воздуха.

Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) Китта—Тароци — традиционная среда для культивирования анаэробов. Ее основой служит печеночная вода, которую готовят путем кипячения в воде мелких кусочков говяжьей печени (соотношение 1 : 1). Печеночную воду смешивают с МПБ в соотношении 1 : 2, смесь кипятят, устанавливают необходимый рН и разливают в пробирки по 10 мл. В пробирки добавляют кусочки вареной печени (восстановитель) и затем вносят по 2 мл вазелинового масла. Автоклавируют при 0,5 атм 20 мин. Перед употреблением пробирки со средой кипятят в водяной бане, затем охлаждают и только после этого проводят посев.

Для выращивания анаэробов используют также питательные среды с повышенной вязкостью, поскольку диффузия кислорода в них затруднена.

Полужидкий агар: к МПБ добавляют 0,25...0,75 % агара, 1 % глюкозы, устанавливают рН 7,4, разливают в пробирки высоким столбиком и дробно стерилизуют.

Практикуют культивирование анаэробов в толще плотных сред.

Сахарный агар в трубках Вейона: к 2%-му МПА добавляют 1 % глюкозы, устанавливают рН 7,4. Посевной материал вносят в расплавленную и охлажденную до 48...50 °С среду, перемешивают и разливают по стерильным узким стеклянным трубкам — трубкам Вейона (длина 20...25 см, диаметр 1...1,5 см). Концы трубок закрыты стерильными резиновыми пробками. Колонии анаэробов вырастают в толще питательной среды.

Широко применяют культивирование анаэробов на поверхности плотных питательных сред в чашках Петри.

Из числа плотных сред для культивирования анаэробов довольно часто используют кровяной агар с глюкозой и железосульфитный агар.

Глюкозо-кровоный агар: к 3%-му МПА (рН 7,2...7,4), расплавленному и охлажденному до 50 °С, добавляют 1...2 % стерильного раствора глюкозы, 15...20 % дефибринированной крови барана и разливают по чашкам Петри.

Железо-сульфитный агар (среда Вильсон—Блера): к 100 мл 3%-го МПА (рН 7,4) с 1 % глюкозы при температуре 60 °С добавляют 10 мл 20%-го раствора сульфита натрия и 1 мл 8%-го раствора хлорида железа, затем среду разливают по чашкам Петри. Анаэробы при росте на этой среде восстанавливают сульфит натрия до сульфата натрия, который реагирует с хлоридом железа, образуя черный осадок сульфита железа; колонии бактерий окрашены в черный цвет.

Для культивирования анаэробов на поверхности плотных питательных сред недостаточно добавления в них восстанавливающих агентов. Культуральные сосуды с посевами помещают в герметические камеры (анаэроостаты), в которых тем или иным способом создают анаэробные (бескислородные) условия.

Обычный анаэроостат представляет собой металлический цилиндр, который герметически закрывает крышка с резиновой прокладкой (рис. 36). На крышке размещены манометр и краны для откачивания воздуха или наполнения анаэроостата инертным газом (азот). Воздух откачивают с помощью вакуумного насоса, закручивают вентиль и анаэроостат с пробирками или чашками помещают в термостат. Обычное остаточное давление в анаэроостате около 10 мм рт. ст. Созданы анаэроостаты, удаление кислорода из которых происходит за счет его реакции с водородом в

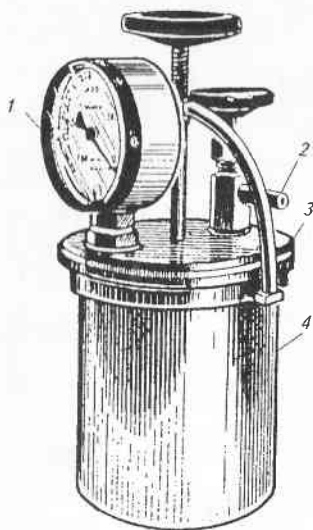


Рис. 36. Анаэростат:

1 — манометр; 2 — кран для отвода воздуха; 3 — крышка; 4 — цилиндрическая емкость для размещения посевов

присутствии катализатора (платиновый, палладиевый). Водород в камеру закачивают из баллона через редуктор. Некоторые анаэробные камеры снабжены нагревательными элементами с терморегулирующим устройством, обеспечивающим автономное поддержание температуры на необходимом уровне.

Культивирование микроаэрофильных бактерий. Хотя микроаэрофильные бактерии по типу дыхания аэробы, они растут не в обычной атмосфере (21 % кислорода), а с пониженным содержанием кислорода.

Например, *Campylobacter fetus* растет в атмосфере, содержащей не более 6 % кислорода. Такую атмосферу можно создать в герметичных термостатах, анаэростатах, заменяя часть воздуха сжатым оксидом углерода (IV) из баллона, или в обычном эксикаторе. В последнем случае пробирки с посевами помещают в эксикатор вместе с бюксом, содержащим ватку, смоченную спиртом, или свечу. Вату (свечу) зажигают и закрывают крышку эксикатора. Пламя затухает по мере выгорания кислорода, и снижение его содержания достаточно для роста микроаэрофилов.

Наиболее доступен и эффективен способ культивирования микроаэрофилов в полужидкой среде с 0,1...0,4 % агара. В такой среде конвекционные потоки не способны перемешивать верхние, богатые кислородом слои среды с нижними, что создает в среде, заполняющей пробирку, градиент концентрации кислорода. Культуру микроаэрофила засевают уколом, и микроорганизм растет в зоне с оптимальным содержанием кислорода, обычно в виде тонких дисков на расстоянии от нескольких миллиметров до нескольких десятков миллиметров от поверхности среды.

Культивирование грибов. Лучший рост грибов отмечен на средах с содержанием углеводов 1...4%. При первичной изоляции для подавления роста различных сопутствующих бактерий в питательные среды часто добавляют антибиотики.

Агар Сабуро применяют для культивирования возбудителей дерматомикозов и кандидамикоза. Глюкоза — 4 г, пептон — 1 г, агар — 1,8 г, дистиллированная вода — 100 мл. После растворения агара среду фильтруют, разливают по пробиркам и

стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. После стерилизации рН среды 6,9...7,0.

Агар Чапека используют для культивирования грибов многих видов. Глюкоза — 30 г, нитрат натрия — 2 г, дигидрофосфат калия — 1 г, сульфат магния — 0,5 г, хлорид калия — 0,5 г, сульфат железа — 0,0012 г, агар — 20 г, дистиллированная вода — 1000 мл. Естественный рН среды 5,6...5,9. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Сусло-агар предназначен для культивирования возбудителей дерматомикозов и кандидамикоза. Солодовое неохмеленное сусло разбавляют водопроводной водой в соотношении 1 : 2 (до содержания сахаров 7%), устанавливают рН 6,5...6,7, добавляют 2 % агара, кипятят, фильтруют, стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Агар Литмана пригоден для культивирования дерматофитов. Пептон — 10 г, глюкоза — 10 г, бычья желчь — 15 г, кристаллвиолет — 0,01 г, агар — 20 г, дистиллированная вода — 1000 мл. Среду стерилизуют при 1 атм 15 мин.

Среда Ван-Итерсона предназначена для выделения из кормов токсичных грибов, вызывающих стахиботриотоксикоз, дендродохиотоксикоз и др. Нитрат аммония — 0,5 г, дигидрофосфат калия — 0,5 г, водопроводная вода — 1000 мл. Среду стерилизуют при 1 атм 30 мин. Затем средой увлажняют стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой.

Жидкая среда Чапека. Глюкоза — 30 г, нитрат натрия — 2 г, дигидрофосфат калия — 1 г, сульфат магния — 0,5 г, хлорид калия — 0,5 г, сульфат железа — 0,001 г, дистиллированная вода — 1000 мл. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. После стерилизации рН среды 5,9...6,2. Жидкую среду можно использовать для увлажнения фильтровальной бумаги в чашках Петри с целью последующего культивирования грибов.

Среда Билай предназначена для получения макроконидий грибов. Нитрат калия — 2 г, дигидрофосфат калия — 1 г, сульфат магния — 0,5 г, хлорид калия — 0,5 г, сульфат железа — следы, крахмал растворимый — 0,1 г, сахароза — 0,1 г, глюкоза — 0,1 г, дистиллированная вода — 1000 мл. Среду разливают по пробиркам по 5 мл и в каждую пробирку вставляют полоску фильтровальной бумаги таким образом, чтобы большая часть ее находилась над раствором. Среду стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Глюкозный бульон Сабуро используют для культивирования грибов многих видов. Глюкоза — 40 г, пептон — 10 г, дистиллированная вода — 1000 мл. Нагревают до кипения, разливают по пробиркам и стерилизуют при 1 атм 15 мин.

Культивирование на волосах по Ван-Брейзегему применяют при выделении дерматофитов. Здоровые стерильные волосы прикрепляют коллодием к стеклянной трубочке. На середину волос наносят культуру гриба.

Трубочку помещают в цилиндр, на дно которого для влажности наливают небольшое количество воды. Культивируют при 25 °С пять—десять дней и более.

Для выделения возбудителей гистоплазмоза, эпизоотического лимфангита применяют кровяной агар.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить скошенный МПА, сывороточный и кровяной МПА.
2. Изучить устройство анаэрогастата и ферментера.

Контрольные вопросы

1. Какие общие требования предъявляют к питательным средам?
2. На какие группы классифицируют питательные среды?
3. Как культивируют анаэробы и микроаэрофилы?

Тема 8

ТЕХНИКА ПОСЕВА, МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БАКТЕРИЙ

Цель занятия. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды и методы выделения чистых бактериальных культур. Ознакомить студентов с основными культуральными характеристиками микроорганизмов и методами определения количества бактерий.

Оборудование и материалы. Бульонные и агаровые культуры *B. cereus*, *E. coli* и *S. aureus* в пробирках и в чашках Петри, смешанная бульонная культура *E. coli* и *S. aureus*, стерильные МПА и МПБ в пробирках, чашках Петри, солевой МПА (8% хлорида натрия) в чашках Петри, стеклянные шпатели, стерильные пипетки Пастера, бактериологические петли.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

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

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

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

Техника посева микроорганизмов. Посевы из нативного материала чаще проводят пастеровской пипеткой, из культур микроорганизмов — бактериологической петлей в зоне стерильного воздуха над пламенем горелки. На культуральных сосудах (пробирки, чашки Петри, колбы и т. д.) пишут номер экспертизы, под которым зарегистрирован материал, дату посева.

Посев на жидкую питательную среду. Пробирку с исследуемым материалом и пробирку с питательной средой держат в левой руке, в правую руку берут бактериологическую петлю или пипетку и пробки от пробирок (рис. 37). Над пламенем горелки обжигают края пробирок, бактериологическую петлю (пипетку) вводят в пробирку с материалом, переносят материал в пробирку со стерильной питательной средой и стряхивают с петли в среду, не смачивая при этом петледержатель. Края пробирок вновь проводят над пламенем горелки, закрывают пробирки пробками, стерилизуют петлю и ставят ее в штатив. Использованную пипетку опускают концом вниз в банку с дезинфицирующим раствором.

Посев на плотную питательную среду. Выполняют разными способами.

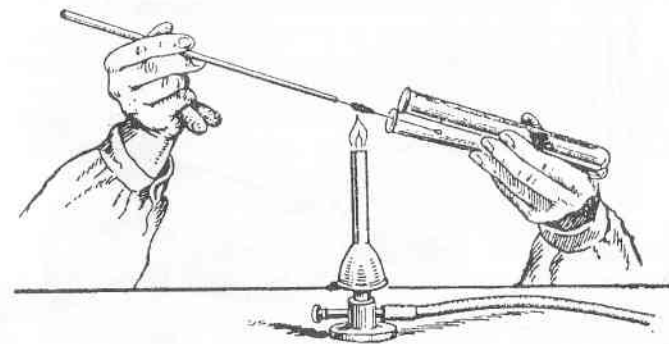


Рис. 37. Посев микроорганизмов на жидкую питательную среду в пробирки

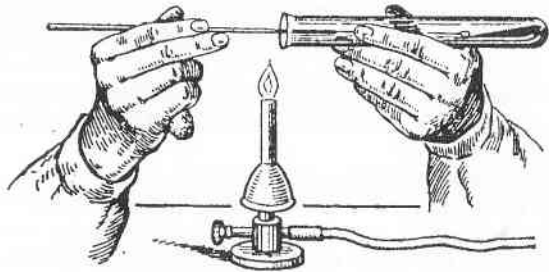


Рис. 38. Посев микроорганизмов «штрихом» на скошенный агар

При посеве в пробирку: 1) пробирки с засеваемой микробной культурой и питательной средой (МПА) берут в левую руку, пробирку с МПА держат скошенной поверхностью среды вверх. В открытую у пламени пробирку с микробной культурой (или другим материалом) вводят простерилизованную бактериологическую петлю, слегка прикасаясь петлей к поверхности среды (материала), берут материал, переносят его в пробирку со стерильной питательной средой. Петлю опускают до дна пробирки, погружают в конденсационную жидкость и зигзагообразным движением проводят снизу вверх по поверхности среды (посев «штрихом») (рис. 38). Пробирки закрывают пробками, петлю прожигают. Пробирки с посевами ставят в термостат; 2) при посеве уколом в столбик среды пробирку с плотной (нескошенной) средой берут в левую руку, над пламенем горелки извлекают из пробирки пробку, петлей с материалом прокалывают вертикально по центру пробирки питательную среду, петлю вынимают, прожигают, пробирку с засеянной средой закрывают пробкой (рис. 39).

Рис. 39. Посев в столбик агара уколом



Рис. 40. Посев микроорганизмов на чашку Петри

При посеве на чашку Петри: чашку берут в левую руку, большим пальцем левой руки слегка приподнимают крышку, обжигают на пламени горелки края чашки в зоне щели, вносят посевной материал на поверхность питательной среды, затем растирают его при помощи стеклянного шпателя или бактериологической петли (рис. 40).

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

Выделение чистых культур микроорганизмов. При бактериологическом исследовании искомым микроорганизм обнаруживают в материале, как правило, в смеси с бактериями других видов. Классическими методами бактериологии возможно идентифицировать микроорганизм только при условии, что он находится в виде чистой культуры.

Методы, основанные на механическом разобщении клеток. Эти методы наиболее часто применяют при выделении чистых культур микроорганизмов.

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

Метод Коха (метод заливок): исследуемый материал в небольшом количестве вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до $45...50^{\circ}\text{C}$ МПА, перемешивают, затем каплю питательной среды переносят во вторую пробирку с расплавленным МПА и т. д. Количество разведений зависит от предполагаемой численности микроорганизмов в исследуемом материале. Затем содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, после затвердения среды посеvy помещают в термостат. Фиксированные в плотной среде микробные клетки при размножении формируют колонии, из которых можно отвить (пересевить) чистую культуру микроорганизма.

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

Более экономичен следующий способ получения изолирован-

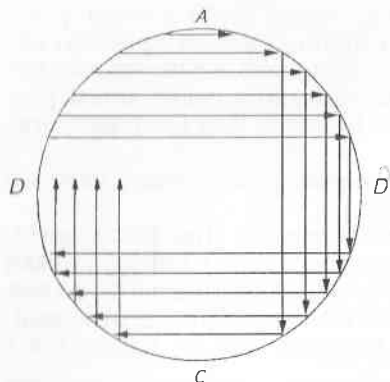


Рис. 41. Схема дробного посева на МПА в чашки Петри

ных колоний. Бактериологической петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри с питательным агаром (рис. 41). Петлю прожигают в пламени горелки, дают остыть и часть материала из первого сектора (А) аналогичным образом распределяют во втором секторе (В), затем в третьем (С) и четвертом (Д) секторах. Даже при рассеивании бактериальной массы из колоний в секторе Д при таком способе получают рост изолированных колоний.

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

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

Использование селективных питательных сред, которые содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры (антибиотики, красители и т. д.), — частый прием при исследовании контаминированного материала. Однако необходимо учитывать, что селективные факторы часто находятся не в бактерицидных, а в бактериостатических концентрациях, поэтому клетки сопутствующих микроорганизмов не растут, но остаются жизнеспособными на поверхности питательной среды и при отгивке колоний исследуемой культуры на обычные среды могут быть причиной получения смешанной культуры.

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

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

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

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

На **плотных средах** изучают колонии микроорганизмов. Бактерии каждого вида формируют колонии с определенными признаками, которые обычно учитывают при идентификации. Размер колоний: крупные — диаметром 4...6 мм и более, средние — 2...4 мм, мелкие — 1...2 мм и точечные колонии диаметром менее 1 мм. Форма колоний может быть правильной круглой, неправильной (амебовидной, розеткообразной), корневидной (рис. 42). Цвет зависит от способности микроорганизма образовывать пигмент: белый, желтый, красный, сине-зеленый и т. д. Бактерии, не синтезирующие пигмент, формируют бесцветные колонии. Учитывают характер поверхности, которая может быть шероховатой, блестящей, матовой, сухой, влажной, гладкой, радиально или концентрически исчерченной. Края колонии могут быть ровными, волнистыми, зубчатыми, бахромчатыми, их исследуют невооруженным глазом и под малым увеличением микроскопа (рис. 43). Рельеф (профиль) определяют, рассматривая колонию сбоку; различают плоские, конусообразные, куполообразные, плоские с конусовидным центром или углублением в центре колонии, с утолщенными (валикообразными) краями (рис. 44). Учитывают прозрачность колонии: непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная. Структура может быть однородной, зернистой, волокнистой и т. д. (рис. 45). Ее выявляют при слабом увеличении микроскопа. Консистенция может быть пастообразной, слизистой, плотной (сухой) и т. д.; ее определяют, дотрагиваясь до колоний бактериологической петлей. Колонии некоторых видов врастают в толщу питательной среды, что также опре-

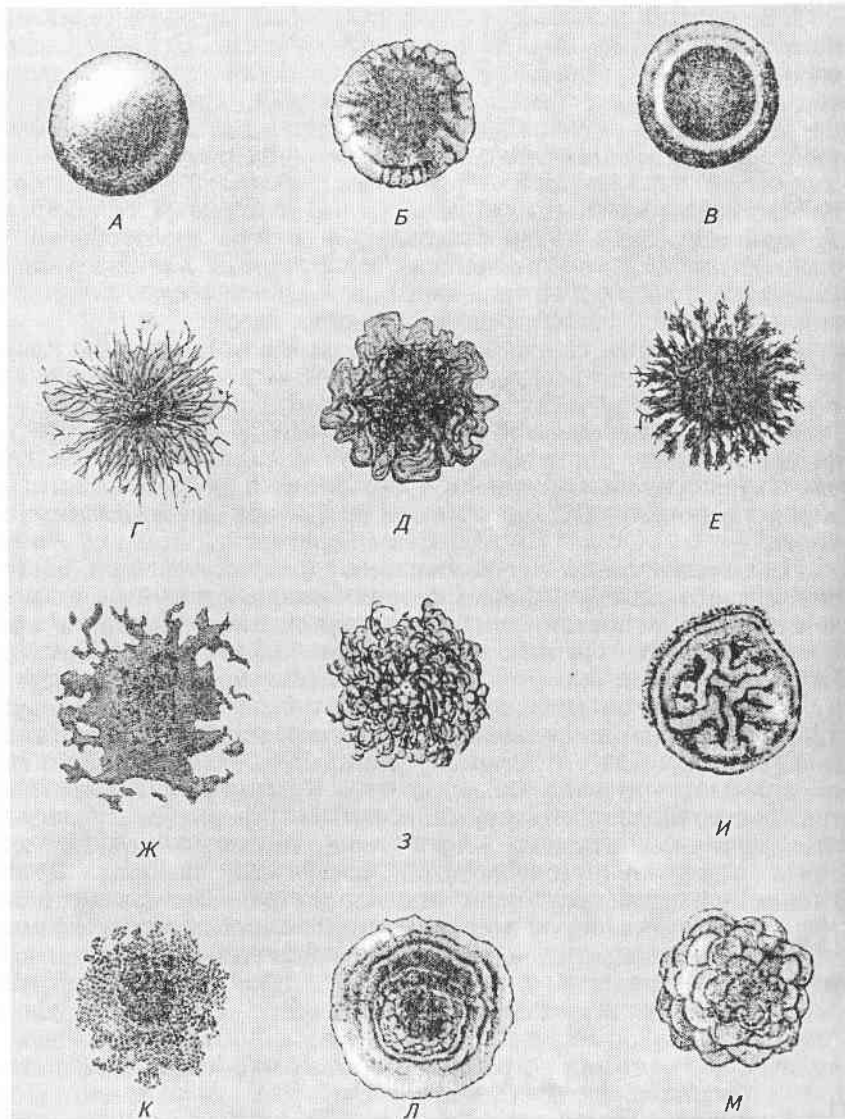


Рис. 42. Форма колоний:

A — круглая; *B* — круглая с фестончатым краем; *B* — круглая с валиком по краю; *G*, *D* — ризоидные; *E* — с ризоидным краем; *Ж* — амёбовидная; *З* — нитевидная; *И* — складчатая; *К* — неправильная; *Л* — концентрическая; *М* — сложная

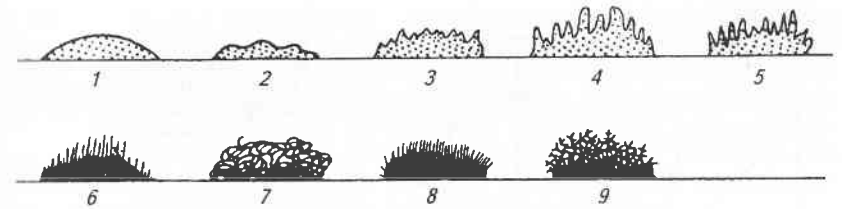


Рис. 43. Край колонии:

1 — гладкий; *2* — волнистый; *3* — зубчатый; *4* — лопастной; *5* — неправильный; *6* — реснитчатый; *7* — нитчатый; *8* — ворсинчатый; *9* — ветвистый

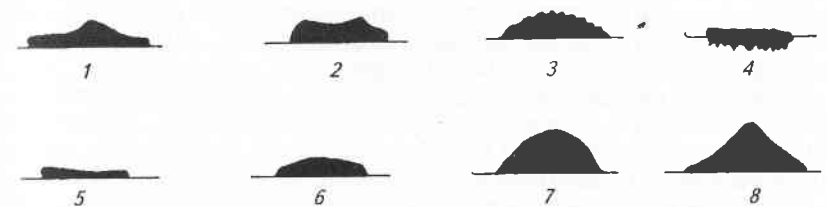


Рис. 44. Профиль колонии:

1 — изогнутый; *2* — кратерообразный; *3* — бугристый; *4* — растающий в субстрат; *5* — плоский; *6* — выпуклый; *7* — каплевидный; *8* — конусовидный

деляют при помощи бактериологической петли. За п а х: многие виды бактерий в процессе роста на питательных средах выделяют специфические ароматические вещества.

Ценную дополнительную информацию об особенностях строения колоний дает их изучение в косопадающем пучке света (рис. 46). Культуры на прозрачной агаровой среде в чашках Петри помещают на предметный столик бинокулярной лупы. Между бинокулярной лупой и источником света помещают зеркало от микроскопа вогнутой стороной вверх таким образом, чтобы лучи, отраженные от него, попадали в плоскость изучаемого объекта под углом 40...45°. Зеркало устанавливают на равном уда-

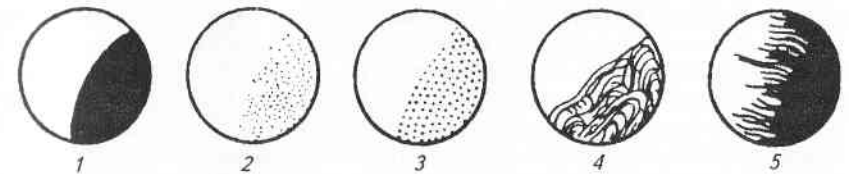


Рис. 45. Структура колонии:

1 — однородная; *2* — мелкозернистая; *3* — крупнозернистая; *4* — струйчатая; *5* — волокнистая

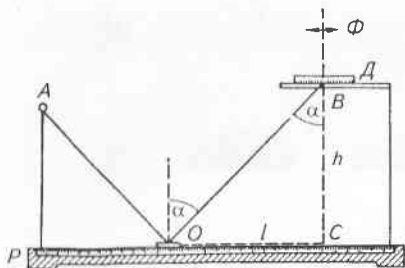


Рис. 46. Схема стационарной установки для изучения микробных культур в косопроходящем свете (по Акаатовой):

A — источник света; O — зеркало; Ф — объектив микроскопа; D — чашка Петри; P — подставка установки с линейкой; AO — OB — ход светового луча

лени от объекта и источника света (12...14 см). При таком освещении колонии бактерий могут быть окрашены в различные цвета. Цвет зависит как от видовых особенностей, так и от состояния культуры (S-, R-формы, см. тему 12).

В *жидких средах* учитывают следующие признаки: степень помутнения среды (интенсивное, среднее, слабое), наличие или отсутствие пристеночного кольца на границе мениска и внутренней поверхности пробирки, характер поверхностной пленки (толщина, цвет, поверхность), характер осадка (обильный, скудный, компактный, хлопьевидный, слизистый). При характеристике осадка пробирку слегка встряхивают и учитывают результат: осадок разбивается в гомогенную равномерную суспензию; образуются мелкие или крупные хлопья, глыбки; слизистый осадок при встряхивании обычно поднимается в виде косички. Пигментообразующие микроорганизмы вызывают окрашивание питательной среды и осадка (желтое, зеленоватое, красное и т. д.).

Определение количества бактерий. При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Определение общего количества микроорганизмов. Можно применить метод прямого счета и метод измерения светорассеяния.

Метод прямого счета: бактерии подсчитывают в камерах Горяева, Тома или в окрашенных мазках. В последнем случае 0,01 мл бактериальной суспензии микропипеткой наносят на предметное стекло и равномерно распределяют на 1 см². Мазок фиксируют, окрашивают и подсчитывают клетки в 10...15 полях зрения по диагонали квадрата. Определяют среднее число клеток в одном поле зрения. Делят 1 см² на площадь поля зрения, которую измеряют методом микрометрии (см. тему 1), затем частное умножают на среднее число микробных клеток в поле зрения, получают их количество в 0,01 мл взвеси бактерий.

Метод измерения светорассеяния считают более точным. Количество света, рассеиваемого суспензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной суспензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы — $0,93 \cdot 10^9$ кл/мл; коклюшной группы — $11 \cdot 10^9$ кл/мл; для бруцеллезных бактерий — $1,7 \cdot 10^9$ кл/мл; туляремийных микробов — $5 \cdot 10^9$ кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1...0,5 мл исследуемой бактериальной суспензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандарта мутности». К суспензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную суспензию, чтобы уравнивать ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной суспензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл суспензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой суспензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную суспензию развели в 10 раз. Известно, что суспензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой суспензии составляет $1,3 \cdot 10^{10}$ кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандарта мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в суспензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на выводе, что бактериальная колония — это результат деле-

ния единичной клетки на плотной питательной среде (исключения составляют бактерии, образующие цепочки из клеток).

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры *E. coli* в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °С (разведение 10⁻¹). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от 10⁻² до 10⁻⁸. Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл наносят на поверхность подсушенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °С 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10...150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести пересев бульонной и агаровой культур бактерий на скошенный МПА и в МПБ в пробирках.
2. Провести посев смешанной бульонной культуры на МПА в чашках Петри по методу Дригальского.
3. Описать характер роста *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* на МПА (колонии) и в МПБ.
4. Определить количество микробных клеток в 1 мл бульонной культуры *E. coli* методом прямого счета и при помощи стандарта мутности.
5. Провести посев бульонной культуры *E. coli* на МПА в чашках Петри с целью определения количества жизнеспособных клеток.

Контрольные вопросы

1. Что такое культура, смешанная культура, чистая культура, штамм и колония бактерий?
2. Какие методы применяют для получения чистых культур микроорганизмов?
3. Какие культуральные признаки учитывают при идентификации бактерий?
4. Какими методами определяют общее число микроорганизмов и количество жизнеспособных клеток?

Тема 9

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ (БИОХИМИЧЕСКИЕ) СВОЙСТВА И ПРИНЦИПЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами изучения ферментативной активности и принципами идентификации микроорганизмов.

Оборудование и материалы. Засеянные среды Гисса (глюкоза, лактоза, сахароза и т. д.) с признаками кислото- и газообразования, культуры *E. coli* на МПБ в пробирках, реактив Эрлиха, культуры *B. subtilis* на молоке, МПЖ, культуры *S. aureus* на МПА в пробирках, 3%-й раствор перекиси водорода и другие тесты, результаты определения ферментативной активности культур *E. coli* и *S. typhimurium* на ПБДЭ-пластинах, карточки с описанием свойств отдельных видов бактерий для работы с определителями.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

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

Наиболее распространены следующие методы регистрации ферментативной активности микроорганизмов.

Выявление сахаролитической активности микроорганизмов. В состав дифференциально-диагностических углеводных сред (среды Гисса — см. тему 7) входят различные соединения, которые можно условно назвать сахарами: моносахариды, полисахариды, многоатомные спирты. При утилизации углеводов в качестве конечных продуктов образуются кислоты и газообразные продукты. Соответственно расщепление углевода регистрируют по изменению pH среды и выделению газообразных продуктов. Закисление питательной среды улавливают при помощи различных индикаторов.

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

Индикатор Андрэда (кислый фуксин — 0,5 г, 1%-й раствор гидроксида натрия — 16 мл, дистиллированная вода — 84 мл) при закислении дает покраснение среды. В жидких средах Гисса образование газов при утилизации субстрата улавливают при помощи поплавков («газовок») — стеклянных трубочек, запаянных в верхнем конце и помещенных в пробирки. В «газовках» скапливаются газы, вытесняющие жидкую питательную среду; в полужидких средах Гисса газообразные продукты остаются в толще среды в виде пузырьков.

Ферментация углеводов иногда происходит медленно, поэтому предварительный учет результатов проводят через 24...48 ч, а окончательный — через 10...14 сут инкубирования посевов.

Тест с метиловым красным показывает степень закисления среды при расщеплении глюкозы. Метилрот как индикатор срабатывает в диапазоне рН 4,4...6,0. Исследуемую культуру выращивают 2...5 сут в жидкой среде Кларка с глюкозой. Затем на 5 мл среды добавляют пять-шесть капель раствора метилрота. Положительный результат — покраснение среды после внесения индикатора (рН 4,0...5,0).

Среда Кларка: пептон — 5 г, гидрофосфат калия — 5 г, глюкоза — 5 г, вода дистиллированная — 1000 мл. Ингредиенты растворяют в воде, кипятят 2...3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 6,9...7,0, разливают по пробиркам и стерилизуют при 112 °С 20 мин.

Тест Фогес-Проскауера выявляет промежуточный продукт расщепления глюкозы — ацетон (ацетилметилкарбинол, диметилкетон). Исследуемую культуру выращивают на среде Кларка. К 1 мл культуры добавляют 0,6 мл 5%-го раствора α -нафтола, перемешивают, вносят 0,2 мл 40%-го раствора гидроксида калия и инкубируют 1 ч. Положительная реакция — красное окрашивание среды.

Выявление протеолитических и других ферментов микроорганизмов. Протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Характер роста микроорганизма на молоке: при посеве исследуемой культуры бактерий на стерильное обезжиренное молоко можно выявить фермент, расщепляющий молочный сахар (лактозу), и протеолитические ферменты, действующие на молочный белок (казеин). Расщепление лактозы приводит к закислению и свертыванию молока, при выделении протеолитических ферментов казеин постепенно растворяется — пептонизируется, в результате чего молоко просветляется, приобретает легкий кремовый оттенок, а на дне пробирки форми-

руется осадок. Свертывание молока может также происходить под влиянием выделяемого некоторыми бактериями «сычужного» фермента, в этом случае реакция молока бывает щелочной. Иногда возможна пептонизация казеина без свертывания молока.

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

Тест на желатиназу: культуру микроорганизма засевают уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12 % желатины. После культивирования опытную и контрольную (незасеянную) пробирки охлаждают под холодной водой и по «текучести» желатины делают заключение о наличии фермента.

Тест на сероводород: узкие полоски фильтровальной бумаги смачивают в 5%-м растворе ацетата свинца, высушивают, стерилизуют. Культуру микроорганизма засевают в питательную среду в пробирке, после чего индикаторную бумагу помещают в пробирку (не должна касаться среды) и закрепляют пробкой. Выделяющийся сероводород реагирует с ацетатом свинца, и образующийся сульфид свинца вызывает почернение бумаги (положительный результат). Описанный метод выявления сероводорода при помощи индикаторных бумажек считают одним из наиболее чувствительных, разработаны и другие методы.

Тест на индол: исследуемую культуру целесообразно выращивать на средах, богатых триптофаном, при расщеплении которого образуется индол (бульон Хоттингера, бульон с 0,1% L-триптофана). К выращенной культуре добавляют 1...3 мл эфира, встряхивают, отстаивают и вносят 0,5 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензоальдегид — 1 г, 96%-й этанол — 95 мл, соляная кислота — 20 мл). Через 5 мин учитывают результат. Появление на границе эфира и питательной среды красно-фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии индола.

Тест на аммиак: исследуемую культуру засевают в жидкую питательную среду в пробирке. Между пробкой и стенкой пробирки закрепляют полоску розовой лакмусовой индикаторной бумажки. Посевы инкубируют в термостате 1...5 сут. Посинение лакмусовой бумажки свидетельствует о выделении аммиака.

Тест на уреазу: исследуемую культуру микроорганизма засевают на среду Кристенсена (пептон — 1 г, хлорид на-

трия — 5 г, дигидрофосфат калия — 2 г, агар — 20 г, глюкоза — 1 г, 0,2%-й раствор фенолрота — 6 мл, 20%-й раствор мочевины — 100 мл, вода дистиллированная — 1000 мл) и выращивают 1...4 сут. Положительный результат — покраснение среды в результате ее защелачивания.

✓ Тест на редукцию нитратов выявляет восстановление нитратов до нитритов. Культуру микроорганизма засевают в МПБ, содержащий 0,2% нитрата калия, инкубируют 48...72 ч, затем в опытную и контрольную пробирки добавляют по 1 мл реактива с крахмалом (растворимый крахмал — 1 г, вода дистиллированная — 100 мл, йодид калия — 0,5 г). К этому раствору перед постановкой реакции добавляют несколько капель 10%-го раствора соляной кислоты. Положительный результат — темно-синее окрашивание.

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

✓ Тест на каталазу: бактериальную массу снимают с поверхности агара бактериологической петлей и суспендируют в капле 3%-го раствора перекиси водорода на предметном стекле. Положительный результат — образование пузырьков газа.

Тест на оксидазу: фильтровальную бумагу пропитывают 1%-м раствором тетраметилпарафенилендиамина дигидрохлорида. Бактериальную массу петлей наносят на поверхность бумажной полоски. Положительный результат — фиолетовое или пурпурное окрашивание через 10...60 с.

Тест на редуцирующую способность бактерий (в метиленовом молоке) основан на следующей особенности: при окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором водорода может быть кроме молекулярного кислорода ряд органических красителей, которые, присоединяя водород, восстанавливаются и обесцвечиваются. Такие свойства отмечены у лакмусовой настойки, метиленового синего, малахитового зеленого и т. д. Например, молоко с метиленовым синим готовят так: молоко подщелачивают 10%-м раствором карбоната натрия до pH 7,2 и добавляют 20 мл 1%-го водного раствора метиленового синего на 1000 мл. Готовая среда голубого цвета. Результат учитывают через сутки инкубирования посевов. В случае редукции красителя среда окрашена в кремовый цвет.

Тест-системы для быстрой идентификации бактерий по группе специально отобранных биохимических признаков обычно представляют собой пластмассовые пластины с лунками (микропробирками), заполненными различ-

ными сухими средами (субстратами). В эти среды вносят суспензию исследуемой культуры и после инкубирования учитывают результат. К тест-системам прилагают таблицы для учета результатов и идентификации микроорганизмов в зависимости от спектра выявленных ферментов.

За рубежом разработаны тест-системы для идентификации энтеробактерий, анаэробов, несбраживающих бактерий и т. д. В России Нижегородский институт микробиологии и эпидемиологии выпускает тест-систему подобного типа — биохимические пластины для идентификации энтеробактерий (ПБДЭ), кроме того, разработаны тест-системы для санитарно-микробиологических целей.

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

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам (см. тему 12), которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы, например группа № 20 «Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы» или группа № 5 «Факультативно-анаэробные грам-отрицательные палочки». В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкто-

риальных, культуральных, биохимических, патогенных свойств с каким-либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к био-, серо-, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с тестами, характеризующими ферментативные свойства бактерий (ферментация углеводов в средах Гисса, образование индола, сероводорода; тесты на каталазу, оксидазу, желатиназу и т. д.).

2. Используя карточки с описанием свойств бактериальной культуры, при помощи определителя микробов установить ее видовую принадлежность.

3. Оценить результаты изучения ферментативной активности двух бактериальных культур семейства *Enterobacteriaceae* на ПБДЭ-пластинах и определить их вид при помощи прилагаемой дифференциальной таблицы.

Контрольные вопросы

1. Какое таксономическое значение имеет определение набора ферментов у микроорганизмов?
2. Что представляют собой современные тест-системы для изучения ферментативной активности микроорганизмов?
3. Что такое определители бактерий?

Тема 10 БАКТЕРИОФАГИ

Цель занятия. Ознакомить студентов с действием бактериофагов и их практическим использованием.

Оборудование и материалы. Культура вакцинного штамма *L. monocytogenes*, набор листериозных бактериофагов, стерильный МПБ, содержащий 0,5% глюкозы, 2%-й МПА в чашках Петри, стерильные пипетки Пастера, лечебно-профилактический бактериофаг против паратифа и колибактериоза телят, чувствительная к фагу культура *E. coli*.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Бактериофаги представляют собой вирусы, адаптировавшиеся в процессе эволюции к паразитированию в прокариотических клетках (рис. 47). Репродукция многих бактериофагов в клетке приводит к ее лизису. На специфической адаптации фагов к строго определенным видам (штаммам) бактерий и внешнем проявлении поражения бактериальных клеток (лизис) основано практическое использование бактериофагов: при помощи известного (диагностического) фага можно обнаружить и идентифицировать бактерии. Кроме того, биологическая промышленность выпускает лечебно-профилактические бактериофаги.

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

В бактериологические пробирки разливают по 4,5 мл стерильного МПБ; в первую пробирку вносят 0,5 мл исследуемого фага, затем готовят его десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-10} . К разведениям бактериофага добавляют по капле суточной бульонной культуры чувствительного к данному фагу вида бактерий, инкубируют при 37°C 24 ч. За титр фага принимают его максимальное разведение, еще способное вызвать лизис бактерий — среда в пробирке прозрачна. Фаг считают активным при титре $10^{-7} \dots 10^{-8}$.

Определение количества бактериофага (по методу Грация). Готовят десятикратные разведения исследуемого фага в физиологическом растворе (10^{-1} , 10^{-2} и т. д.), затем из последнего разведения, например 10^{-7} или 10^{-8} , берут 0,5 мл жидкости, смешивают с равным объемом чувствительной к данному бактериофагу бульонной культуры бактерий. Полученную смесь добавляют к 4 мл расплавленного 0,7%-го МПА (температура 45°C), перемешивают и выливают на поверхность подсушенного питательного агара в чашку Петри. Аналогичным образом поступают со всеми разведе-

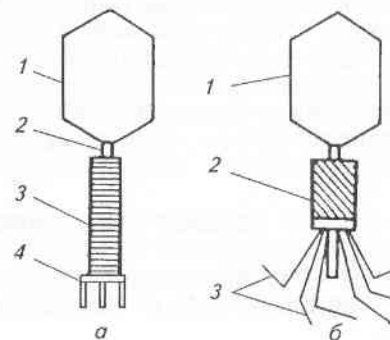


Рис. 47. Схема строения фага T2 по данным электронной микроскопии:

а — с нуклеиновой кислотой в головке: 1 — головка; 2 — полая центральная часть; 3 — оболочка (расправленная); 4 — базальная пластинка; б — без нуклеиновой кислоты в головке: 1 — головка; 2 — оболочка (сокращенная); 3 — хвостовые нити

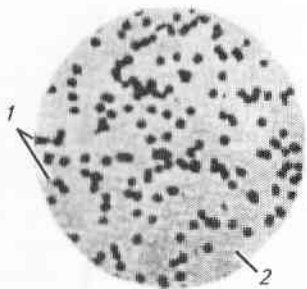


Рис. 48. «Бляшки», образованные фагом:

1 — стерильные пятна в слое бактерий на поверхности питательной среды — «бляшки»; 2 — сплошной слой бактериальной массы на поверхности питательной среды (газолах)

деннями бактериофага (10^{-6} , 10^{-5} и т. д.). Чашки инкубируют в термостате при 37°C 24 ч.

Учет результатов: не пораженные бактериофагом бактерии растут и образуют сплошной газон на поверхности питательного агара. Клетки, пораженные фагом, лизируются, и в этой зоне можно видеть «стерильные» пятна на сплошном бактериальном газоне. Количество этих пятен («бляшек») соответствует количеству фаговых частиц в суспензии (рис. 48).

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

Для идентификации неизвестной культуры бактерий при помощи диагностического бактериофага обычно используют плотную питательную среду. Например, исследуемую 18-часовую культуру, предположительно листерий, засевают в МПБ с глюкозой, инкубируют при 37°C 4 ч до легкой опалесценции среды и затем засевают газоном (0,1 мл) на подсушенный 2%-й МПА в чашку Петри. Через 1...1,5 ч инкубирования посевов при 37°C при слегка приоткрытой крышке на одну половину газона наносят каплю листериозного бактериофага 2А и на вторую половину помещают каплю фага 4А. Посевы инкубируют при $22...25^{\circ}\text{C}$ 16...24 ч.

Учет результатов: если культура листериозная, то на месте нанесения хотя бы одного фага можно видеть прозрачную зону лизиса.

Для установления фаговара исследуемую культуру проверяют с набором типовых фагов, охватывающих все фаговарианты данного вида бактерий, определяют, к какому фагу чувствителен данный штамм, что и служит его маркером.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Определить активность лечебно-профилактического коли-паратифозного фага по отношению к исследуемой культуре *E. coli*.

2. Провести идентификацию культуры *L. monocytogenes* при помощи листериозных диагностических фагов.

Контрольные вопросы

1. Что такое бактериофаг?
2. Как используют бактериофаги?
3. Какими методами титруют бактериофаги?

Тема 11

АНТИБИОТИКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Оборудование и материалы. Стерильные чашки Петри с МПА, пробирки с чистой культурой стафилококка и кишечной палочки, стерильные градуированные «концевые» пипетки на 2 мл, резиновые груши, набор стандартных дисков с разными антибиотиками, стерильные пинцеты, линейки.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Антибиотики. Эти вещества, образуемые бактериями, грибами, растениями, животными тканями, способны убивать микроорганизмы или подавлять их рост. Абсолютное большинство известных антибиотиков получают из актиномицетов. Бактерии синтезируют такие антибиотики, как полимиксины, грамидины, бацитрацин, гризин. Из грибов выделены пенициллины, цефалоспорины, фумагиллин, гризофульвин, из животных тканей — эритролин, экмолин, из высших растений — аллицин и др. Часть антибиотиков получают химическим синтезом (левомицетин), а большинство — биосинтезом. Активность препаратов определяют бактериологическими или физико-химическими методами. Биологическую активность антибиотиков выражают в условных единицах действия — ЕД. За 1 ЕД принимают специфическую активность, содержащуюся в 1 мкг чистого препарата, но для бензилпенициллина 1 ЕД равна 0,5988 мкг химически чистой натриевой соли препарата. Активность товарных антибиотиков чаще всего выражают в мкг активного вещества, содержащегося в 1 мг препарата.

Успех лечения инфекционных заболеваний человека и животных зависит от выбора эффективного лекарственного средства с учетом чувствительности к нему возбудителя болезни. Материал для лабораторного исследования следует брать до лечения анти-

микробными препаратами. Чувствительность микроорганизма к антибиотикам определяют с чистой культурой возбудителя.

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

Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков). Это наиболее простой в исполнении метод. В качестве питательной среды применяют МПА, агар на переваре Хоттингера с содержанием 120...140 мг% аминного азота (рН 7,2...7,4) или агар фирмы «Дифко». Диски с антибиотиками (диаметр 5...6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4...20 °С.

Расплавленную питательную среду разливают в чашки Петри по 20 мл (толщина слоя 4...5 мм). Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате. Для посева используют суточную бульонную культуру или смывы суточной агаровой культуры. 1 мл микробной суспензии в физиологическом растворе (концентрация клеток 10^9 /мл) наносят на агар и покачиванием чашки распределяют по поверхности питательной среды. Избыток жидкости удаляют стерильной пастеровской пипеткой. Засеянные чашки Петри подсушивают при комнатной температуре 30...40 мин, а затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37 °С 18 ч в положении вверх дном.

Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя таким образом вокруг диска зону отсутствия роста (рис. 49). Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура.

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

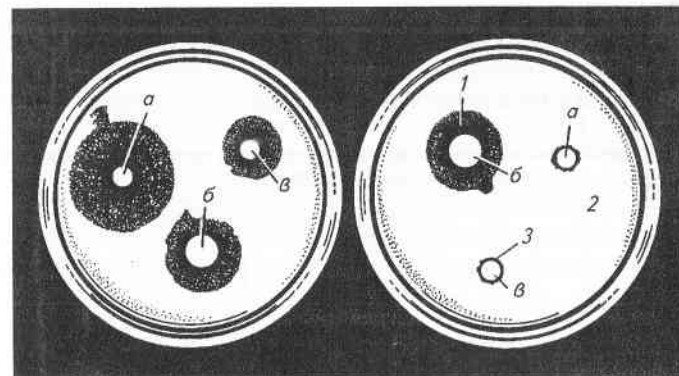


Рис. 49. Различная чувствительность двух штаммов стафилококков к антибиотикам:

а — к пенициллину; б — к стрептомицину; в — к неомицину; 1 — зона задержки роста (стерильная зона); 2 — сплошной рост бактерий на поверхности питательной среды; 3 — бумажный диск с антибиотиком

Чтобы получить более точные результаты исследования, необходимо соблюдать стандартные условия при постановке опыта. Для проверки точности и стандартности определения чувствительности к антибиотикам Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует контролировать диски на эталонных штаммах микроорганизмов, которыми служат три культуры из Американской коллекции типовых культур или из Национальной коллекции типовых культур в Англии: *S. aureus* (ATCC 25923, № СТС 6571), *E. coli* (ATCC 25922, № СТС 10418), *P. aeruginosa* (ATCC 27853, № СТС 10662).

Метод серийных разведений. Для проведения опыта готовят основные растворы антибиотиков, используя стандарты антибиотиков. На этикетке ампулы со стандартом указана концентрация антибиотика в ЕД/мл или мкг/мл. Навески бензилпенициллина калиевой или натриевой соли, ампициллина тригидрата, оксациллина натриевой соли, цефалотина, цефалексина растворяют в $1/15$ М фосфатном буфере. Основные растворы тетрациклиновых антибиотиков готовят на 0,01 н. растворе соляной кислоты. Для приготовления основных растворов нео-, моно-, канамицина используют дистиллированную воду. Концентрация основных растворов антибиотиков 1000 мкг/мл.

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

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

Схема опыта приведена в таблице 2.

2. Определение чувствительности микроорганизма к антибиотику (в жидкой питательной среде)

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----------------|---|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й | 7-й | 8-й | 9-й | 10-й | 11-й | 12-й | 13-й | 14-й (контроль) | |
| Питательная среда | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | |
| Основной раствор антибиотика | 4,5 | | | Последовательный перенос по 4,5 мл*, начиная с 1-й пробирки | | | | | | | | | | | — |
| Культура микроорганизма | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | |
| | Перемешивают встряхиванием. Инкубируют в термостате при 37 °С 18...20 ч | | | | | | | | | | | | | | |

*Из 13-й пробирки убрать 4,5 мл.

Первая пробирка содержит 500 мкг/мл антибиотика, каждая последующая — в два раза меньше.

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

Метод серийных разведений на плотной питательной среде: для определения чувствительности к антибиотикам большинства микроорганизмов используют МПА или агар на переваре Хоттингера с содержанием аминного азота 120...140 мг/мл, рН 7,2...7,4. Приготовленный основной раствор антибиотиков разводят в плотной питательной среде. Для этого к расплавленному и охлажденному до 55 °С агару, разлитому в широкие пробирки по 18 мл, добавляют по 2 мл соответствующего разведения определенного антибиотика, тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки Петри подсушивают в течение 1 ч. Контрольные чашки Петри с агаром не содержат антибиотика. Все чашки Петри делят на сектора, каждый из которых засевают исследуемой культурой. Посев делают бактериологической петлей

из микробной суспензии с концентрацией клеток $10^6...10^7$ /мл. Чашки помещают в термостат при 37 °С на 20...24 ч.

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

ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

Определить чувствительность культуры стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков.

Контрольные вопросы

1. Что такое антибиотики?
2. Как используют антибиотики в ветеринарии?
3. Какими методами определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам?
4. Что принимают за минимальную подавляющую концентрацию антибиотика?

Тема 12

ГЕНЕТИКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Ознакомить студентов с фенотипической и генотипической изменчивостью и генетическими методами идентификации микроорганизмов.

Оборудование и материалы. Культура *Proteus vulgaris*, пробирки с 2%-м МПА, 1%-й раствор фенола, пробирки с 10 мл и с 1 мл МПБ, чашки Петри с 3%-м МПА, содержащим 100 ЕД стрептомицина в 2 мл среды, чашки Петри с обычным МПА, стерильные мерные пипетки на 1 мл, диссоциирующая культура *E. coli* или *P. multocida* на МПА в чашках Петри в виде изолированных колоний, бинокулярная лупа МБС-1, культура *E. coli*, продуцирующая колицин, и колицинчувствительная культура *E. coli*, чашки Петри с 1,5%-м МПА, хлороформ, пробирки с 0,7%-м МПА, штаммы *E. coli* K12F⁻, *leu*⁻, *str*^r, *E. coli* K12 Hfr, *leu*⁺, *str*^s, *E. coli lac*⁻, трансдуцирующий фаг λ *dgal*, содержащий β -галактозидазный оперон *E. coli*; набор компонентов для ПЦР-диагностики какой-либо инфекционной болезни, амплификатор.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Генетика микроорганизмов. Природа изменений свойств микроорганизмов может быть наследственной (генотипической) и ненаследственной (модификационной, фенотипической).

Модификационная изменчивость. В отличие от мутаций затрагивает сразу большое количество клеток в популяции.

Модификации — это ненаследуемые фенотипические изменения, которые возникают под влиянием различных факторов, но после прекращения их действия исчезают. При этом клетки с одинаковым генотипом могут различаться по фенотипу.

Генотипическая изменчивость. Может быть мутационной, обусловленной изменениями в ДНК под влиянием мутагенов, и комбинативной, связанной с процессом образования новых комбинаций генов в генотипе.

Мутации проявляются фенотипически в виде изменения какого-либо признака, присущего микроорганизму, — физиологического, морфологического. Различают индуцированные и спонтанные мутации. Последние возникают под влиянием неустойчивых факторов и достаточно редки в популяции ($1 \cdot 10^{-5}$... $1 \cdot 10^{-7}$).

Реконбинация — обмен генетическим материалом между двумя бактериальными клетками. Клетку, воспринимающую генетический материал, называют реципиентом, отдающую — донором. Реконбинантные клетки содержат в составе своего генома фрагменты хромосомы донора. Механизм проникновения донорской ДНК в клетку реципиента может быть различен: 1) трансформация — «голая» ДНК проникает в клетку реципиента без взаимного контакта клеток; 2) трансдукция — перенос фрагментов ДНК из клетки донора в реципиентную клетку умеренным бактериофагом; 3) конъюгация — перенос фрагмента ДНК при непосредственном контакте клеток донора и реципиента. В процессе конъюгации из одной клетки в другую может переходить плазмидная ДНК. Плазида (*F*-фактор) представляет собой внехромосомные небольшие кольцевые молекулы ДНК разной длины. Плазмиды обычно обозначают по характерному свойству клетки-хозяина: *R*-фактор — плазида, обеспечивающая устойчивость к лекарственным препаратам, *Col*-фактор — плазида, детерминирующая синтез клеткой антибиотикоподобных веществ (колицинов, бактериоцинов) и т. д.

Выявление модификационной изменчивости. В пробирку с 6 мл расплавленного МПА добавляют 0,6 мл 1%-го раствора фенола, агар сквашивают. В пробирки с фенолизированным и обычным МПА засевают культуру *Proteus vulgaris* по методу Шукевича в конденсационную воду. Посевы инкубируют при 37...38 °С 24 ч и учитывают характер роста протей на фенолизированном и обычном МПА. На фенолизированном агаре протей в отличие от обычного МПА не проявляет феномена «роения».

Выявление мутационной изменчивости во флуктуационном тесте Лурия—Дельбрюка. Данный тест используют для изучения природы возникновения различных свойств у бактерий: устойчивости к бактериофагу, лекарственным препаратам, способности расщеплять углеводы и т. д. В соответствии с гипотезой адаптации каждая клетка в популяции в присутствии того или иного фактора — фага, антибиотика и т. д. — может с некоторой долей вероятности приобрести устойчивость к нему (адаптироваться). Согласно гипотезе спонтанных мутаций каждая клетка бактерий также с небольшой долей вероятности может приобрести устойчивость к тому или иному фактору в результате мутаций независимо от присутствия этого фактора в среде обитания.

С помощью флуктуационного теста Лурия—Дельбрюка можно подтвердить мутационную природу возникшего свойства.

Готовят два ряда культур.

1. «Параллельные» культуры: в пробирку, содержащую 10 мл МПБ (обозначим ее № 1), и в 10 пробирок, содержащих по 1 мл МПБ (№ 2...11), одновременно высевают одинаковое количество клеток *E. coli* (300...500 бактериальных клеток на пробирку). Посевы инкубируют при 37 °С 24 ч.

2. «Независимые» культуры: в 20 чашек Петри разливают МПА с добавлением стрептомицина (конечная концентрация антибиотика 100 ЕД на чашку). Первые 10 чашек засевают по 0,1 мл культурой, взятой из пробирки № 1; следующие 10 чашек засевают по 0,1 мл культурами, взятыми из пробирок № 2...11. Посевы инкубируют при 37 °С 24 ч. После инкубирования подсчитывают число выросших колоний на всех чашках Петри с «параллельными» и «независимыми» культурами.

На стрептомициновом агаре давать колонии могут только устойчивые к стрептомицину клетки *E. coli*.

Примерно одинаковое число колоний на всех чашках (нет статистически достоверных отличий) подтверждает теорию адаптации. Если же на чашках, засеянных культурами из пробирок № 2...11, наблюдают существенную разницу в числе колоний, а на чашках, засеянных культурой из пробирки № 1, нет статистически достоверных отличий, то можно говорить о мутационной природе наблюдаемой стрептомицинустойчивости. Мутации — редкое событие, и при посеве из отдельных пробирок мутанты вырастают только в некоторых чашках. При посеве же из общей пробирки предсуществующие мутанты будут равномерно распределены в жидкой среде и соответственно в чашках с агаром.

Диссоциация бактерий. Диссоциация — это появление в бактериальной популяции колоний различного типа: *S*-формы (*smooth* — гладкий), *R*-формы (*rough* — шероховатый), что может быть следствием мутаций или рекомбинаций.

Для бактерий в *S*-форме характерны типичные для вида морфологические, ферментативные и вирулентные свойства. У *R*-формы

обычно отмечают меньшую вирулентность, потерю способности к капсулообразованию, нередко изменение ферментативных свойств. Анализ популяции бактериальных штаммов по признаку диссоциации с целью отивки (селекции) *S*-формы — обязательный этап при работе с производственными штаммами. В ходе такой селекции ориентируются на морфологические и оптические характеристики *S*- и *R*-колоний.

Для анализа популяции бактерий с признаками диссоциации (*E. coli*, *P. multocida*) производят дробный рассев исследуемой культуры на МПА в чашки Петри с целью получения изолированных колоний. Посевы культивируют при 37...38 °С 18...24 ч. Чашку Петри с колониями помещают на предметный столик бинокулярной лупы и изучают в косопадающем пучке света (см. тему 8).

Дополнительно из колоний *S*- и *R*-формы делают окрашенные мазки и изучают особенности морфологии клеток.

Выявление бактериальной плазмиды Col⁺ (по методу отсроченного антагонизма Фредерик). Исследуемую культуру *E. coli* засевают уколом в 1,5%-й МПА (обычно 6...8 штаммов на одну чашку). Посевы инкубируют при 37 °С 48 ч. Выросшие колонии убивают парами хлороформа, затем поверхность агара заливают слоем расплавленного и охлажденного до 46...48 °С 0,7%-го агара, смешанного с 0,1 мл 6-часовой бульонной культуры *E. coli*, чувствительной к колицинам. Через 24 ч инкубирования при 37 °С вокруг колоний, продуцирующих колицины, можно видеть зоны подавления роста колицинчувствительной (индикаторной) культуры.

Демонстрация специфической трансдукции. Для проведения опыта необходимы: реципиентный штамм *E. coli lac⁻*, не способный ферментировать лактозу, трансдуцирующий фаг λ *dgal*, геном которого содержит β -галактозидазный оперон *E. coli*.

Смешивают 1 мл 3-часовой бульонной культуры *E. coli* и 1 мл фага с титром 10⁻⁶...10⁻⁷, смесь инкубируют при 37 °С 1 ч. Затем из смеси готовят десятикратные разведения в пробирках. Из пробирки с разведением 10⁻⁶ высевают в три чашки Петри с агаром Эндо по 0,1 мл культуры. Посевы инкубируют при 37 °С 24 ч. Подсчитывают лактозонегативные и лактозопозитивные (трансдуктанты) колонии. Соотносят число трансдуктантов к числу колоний реципиентного штамма (светлые, лактозонегативные колонии) и определяют таким образом частоту трансдукции. Например, выросло 6 колоний красного цвета (трансдуктанты) и 468 светлых колоний (реципиентные), следовательно, частота трансдукции составляет $6/468 = 1,3 \cdot 10^{-2}$.

Демонстрация конъюгации. Для проведения опыта необходимы: реципиентный штамм *E. coli K12F⁻, leu⁻, Str^r*; донорский штамм *E. coli K12 Hfr, leu⁺, Str^s*; минимальная синтетическая среда для обнаружения рекомбинантов (сульфат железа — 0,0005 г,

глюкоза — 2 г, сульфат аммония — 1 г, сульфат магния — 1 г, дигидрофосфат калия — 6,5 г, нитрат кальция — 0,001 г, стрептомицин — 200 ЕД/мл, вода дистиллированная — 1000 мл), аналогичная питательная среда без стрептомицина; полноценный питательный агар со стрептомицином.

В пробирке объединяют 3-часовые бульонные культуры реципиентного и донорского штаммов в соотношении 2 : 1, смесь выдерживают при 37 °С 30 мин, разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 100 и по 0,1 мл высевают на минимальную селективную среду (агаровую). Посевы инкубируют при 37 °С 18...20 ч, затем учитывают рост колоний эшерихий. На этой среде могут расти только клетки рекомбинантов, соединившие в себе устойчивость к стрептомицину (свойство реципиента) и отсутствие зависимости от лейцина (свойство донора). Для отрицательного контроля на минимальную селективную среду высевают культуры донорского и реципиентного штаммов (не должны расти). Для положительного контроля донорский штамм высевают на селективную среду без стрептомицина, а реципиентный штамм — на полноценный питательный агар со стрептомицином (эшерихий должны расти на обеих средах).

Если определить количество жизнеспособных клеток реципиентов в посевном материале и соотнести их с количеством рекомбинантных клеток, то можно рассчитать частоту рекомбинации (см. «Демонстрацию специфической трансдукции»).

Генетические методы идентификации микроорганизмов. Фенотипические признаки бактерий отражают максимум 20 % генотипа, поэтому ученые интенсивно разрабатывают методы и критерии идентификации микроорганизмов, основанные на изучении не фенотипического проявления генома, а особенностей строения ДНК.

Сравнение геномов по составу основания ДНК. ДНК содержит четыре азотистых основания: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г), цитозин (Ц). По правилам спаривания оснований А = Т и Г = Ц, но молярное отношение (Г + Ц) : (А + Т) варьирует у разных видов и может служить таксономической характеристикой.

Поскольку число водородных связей между основаниями в парах ГЦ больше, чем между основаниями в парах АТ, то о ГЦ-содержании судят по «температуре плавления» ДНК, т. е. по температуре, при которой происходит разрыв водородных связей, соединяющих цепи ДНК. Разделению цепей сопутствует увеличение оптической плотности, которую измеряют спектрофотометром при $\lambda = 260$ нм (максимум поглощения ДНК). По мере нагревания образца ДНК поглощение возрастает и, когда ДНК становится одноцепочечной, кривая поглощения достигает плато.

У каждого бактериального вида ДНК содержит характерное среднее количество ГЦ, и если нуклеотидный состав ДНК у двух сравниваемых микроорганизмов существенно отличается

(10...15 %), то говорят об их принадлежности к различным таксономическим группам. Однако отсутствия существенных отличий в количестве ГЦ у двух видов бактерий недостаточно для заключения о тождестве этих бактерий: необходимо доказать высокое фенотипическое сходство обоих видов или применить другие генетические методы.

Метод гибридизации нуклеиновых кислот. Основан на том, что одноцепочечная ДНК после тепловой денатурации при понижении температуры на 20...30 °С ниже температуры плавления способна реассоциироваться (отжиг) в изначальную двухцепочечную ДНК. Также был установлен факт реассоциации одноцепочечных ДНК от различных видов бактерий с образованием гибридной ДНК, причем чем больше гомология сравниваемых одноцепочечных ДНК, тем успешнее реассоциация. Аналогичным образом можно проводить гибридизацию между РНК и ДНК, тРНК и рРНК.

При проведении гибридизации ДНК один из сравниваемых образцов денатурированной ДНК метят радиоактивным изотопом, образовавшиеся двухцепочечные ДНК отделяют от одноцепочечных и измеряют их радиоактивность. В качестве контроля используют меченую и немеченую ДНК эталонного (известного) штамма микроорганизма. Степень реассоциации таких гомологичных одноцепочечных ДНК принимают условно за 100 %. Существует точка зрения, что при 60...100 % гомологии ДНК можно говорить о принадлежности сравниваемых бактерий к одному виду, при 40...60 % — к одному роду, при 0...25 % гомологии — к родам одного семейства и разным семействам.

Метод генных зондов. Используют достаточно часто для идентификации бактерий. От обычной ДНК—ДНК гибридизации этот способ отличается использованием не тотальной ДНК, а определенного ее фрагмента (зонда), содержащего известный ген (генетический маркер). Предварительно создают «банк генов» изучаемой бактерии. С этой целью бактериальную ДНК расщепляют эндонуклеазами, фрагменты ДНК разделяют электрофоретически, методом трансформации определяют их генетические характеристики, отбирают нужный фрагмент ДНК и при помощи лигазы включают в плазмиду, которая служит вектором. Плазмиду с интегрированным известным геном вводят в какой-либо бактериальный штамм, обычно достаточно легко культивируемый. Получают большое количество биомассы, содержащей ДНК-зонд. Выделяют плазмидную ДНК, метят ее радиоактивным изотопом, затем эту меченую ДНК гибридизируют с ДНК изучаемой бактерии. Методом ауторадиографии выявляют относительную частоту гибридизации маркера с изучаемой ДНК и по этому показателю судят о генетическом родстве известной (бактерии — донора ДНК) и исследуемой бактерий.

Полимеразная цепная реакция — ПЦР (polymerase chain reaction — PCR). Принцип реакции состоит в том, что при помощи ДНК-полимеразы *in vitro* многократно синтезируют копии определенного участка ДНК (амплификация — накопление).

ПЦР — циклический процесс, каждый цикл которого включает в себя три стадии.

1. Проводят тепловую денатурацию (95 °С) исследуемой ДНК. При этом разрушаются водородные связи, соединяющие парные основания, и цепи ДНК расходятся, т. е. образуются одноцепочечные ДНК, которые доступны для праймеров (затравок) и ДНК-полимеразы. Длительность процесса 1 мин.

2. Осуществляют посадку (отжиг) праймеров на комплементарные участки двух антипараллельных цепей ДНК. Праймеры представляют собой два синтетических олигонуклеотида длиной в 20...30 нуклеотидов, каждый из которых комплементарен противоположной цепи ДНК в участках, ограничивающих выбранный сегмент ДНК возбудителя. Таким образом, праймеры ограничивают специфический для возбудителя участок ДНК. Праймеры добавляют в реакционную смесь в избытке, что позволяет им занять свои комплементарные участки до того, как произойдет соединение (ренатурация) одноцепочечных ДНК в двухцепочечную. Длительность стадии 1...2 мин.

3. Идет процесс достройки (элонгации) праймера из внесенных в реакционную смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов при участии ДНК-полимеразы. Используют обычно термостабильную ДНК-полимеразу термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), что позволяет вести полимеризацию при оптимальной температуре 70...75 °С. При синтезе ДНК праймеры включаются в ее молекулу. Синтез ДНК с помощью полимеразы протекает только между праймерами, и при этом удваивается число копий именно этого участка ДНК. Молекула ДНК, синтезированная при помощи одного праймера, может служить матрицей для синтеза комплементарной ДНК при помощи другого праймера. Длительность этой стадии 1...2 мин (рис. 50).

По завершении 1-го цикла реакцию тормозят и ДНК вновь подвергают температурной денатурации. При охлаждении избыточные праймеры опять гибридизируются с цепями исходной и вновь синтезированной ДНК. Добавление ДНК-полимеразы обеспечивает второй цикл полимеризации. Таким образом можно провести несколько десятков циклов ферментативного удлинения праймеров, в результате количество сегментов ДНК, ограниченных с обеих сторон праймерами, с каждым циклом увеличивается экспоненциально. Следовательно, используя метод ПЦР, можно *in vitro* избирательно обогащать препарат ДНК фрагментом с определенной последовательностью в миллион раз и более. Факт увеличения числа фрагментов ДНК служит доказа-

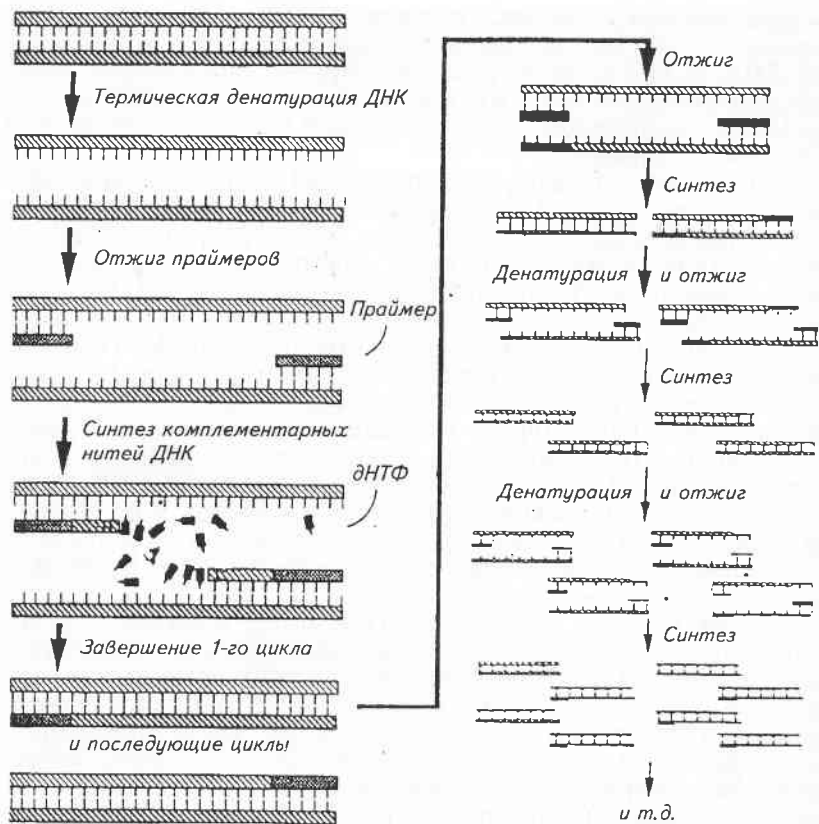


Рис. 50. Схема полимеразной цепной реакции (В. И. Покровский и соавт., 1998)

тельством присутствия в исследуемом образце гомологичной ДНК, т. е. возбудителя инфекционной болезни.

Для практического использования ПЦР необходимо синтезировать праймеры, комплементарные 3'-концам цепей копируемой ДНК-матрицы и ограничивающие копируемый фрагмент ДНК. Их выбирают на основе участков генома возбудителя с расшифрованной нуклеотидной последовательностью и устойчивых к генетическим перестройкам. Например, для идентификации *S. psittaci* были предложены праймеры, выбранные на основе гена, кодирующего белок наружной мембраны, или на основе гена, кодирующего 16s рРНК; для идентификации бруцелл был выбран праймер на основе гена, кодирующего белок внешней мембраны 31 КДа, и т. д.

Для проведения ПЦР-диагностики необходимы следующие компоненты: водные растворы дезоксинуклеозидтрифосфатов четырех типов (gАТФ, gТТФ, gГТФ, gЦТФ, 10 мМ, рН 7,0); первый праймер (5 мМ); второй праймер (5 мМ); фермент Taq-полимераза (5 ЕД/мкл); амплифицируемая ДНК (~ 1 мкг); ионы Mg^{2+} для обеспечения работы полимеразы (25 мМ); буферный раствор (десятикратный концентрат), например, трис-соляная кислота (рН 6,8...7,8) с добавлением бычьего альбумина и неионных детергентов.

Указанные компоненты объединяют в пробирке, например, в следующих количественных соотношениях: раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов — 8 мкл, буфер — 10 мкл, амплифицируемая ДНК — ~ 1 мкг, праймеры — по 1...5 мкл, полимеразы — 0,5 мкл, дистиллированная вода — до 100 мкл. Для предотвращения испарения на жидкость в пробирке наслаивают минеральное масло. На первом этапе проведения ПЦР денатурируют ДНК, затем в реакционную смесь, содержащую дезоксинуклеозидтрифосфаты, вносят полимеразу и помещают в амплификатор или термоциклер (программируемый термостат). Амплификацию проводят в термоциклере по заданной программе, например: 90 °С — 1 мин; 60 °С — 1 мин; 72 °С — 1 мин (5 циклов); 93 °С — 1 мин; 57 °С — 1 мин; 92 °С — 1 мин (5 циклов); 93 °С — 1 мин; 55 °С — 1 мин; 72 °С — 3 мин (25 циклов).

После завершения амплификации следует этап обнаружения продуктов ПЦР — амплификонов. Молекулы ДНК и их фрагменты разделяют электрофорезом в агаровом геле. ДНК в геле окрашивают бромидом этидия с последующим анализом и фотографиями с помощью фореграмм при ультрафиолетовом облучении. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждают сравнением с маркерными фрагментами и ДНК-стандартом. Дополнительно специфичность амплификона можно подтвердить путем гибридизации со специфическим радиоактивным зондом.

Объектом исследования в ПЦР могут служить как ткани, содержащие возбудитель, так и культуры возбудителя. Из материала обычно тем или иным способом извлекают ДНК. В зависимости от характера материала методы его обработки варьируют.

Ценность ПЦР-диагностики возрастает, когда необходимо обнаружить возбудителей инфекционных болезней, или трудно культивируемых, или находящихся в нетипичной форме (*L*-формы бактерий), а также выявить гены, контролируемые тот или иной фактор патогенности микроорганизма.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить и охарактеризовать рост культуры протей на обычном и фенолизированном МПА.

2. Определить природу возникновения стрептомицинрезистентных форм *E. coli* по результатам флукуационного теста Лурия—Дельбрюка.

3. Ознакомиться с диссоциацией бактерий. Описать особенности морфологии S- и R-колоний и бактериальных клеток из них.

4. Ознакомиться с бактериоциногеней (способность выделять антибиотикоподобные вещества) на примере колицинов *E. coli*.

5. Проанализировать результаты опытов по конъюгации, трансдукции и трансформации бактерий.

6. Изучить схему проведения ПЦР, реагенты, аппаратуру.

Контрольные вопросы

1. Какие известны формы изменчивости бактерий?
2. В чем состоит тест Лурия—Дельбрюка?
3. Какова роль плазмид в формировании патогенных свойств бактерий?
4. Какие генотипические методы применяют для идентификации бактерий?

Раздел II

ИНФЕКЦИЯ И МЕТОДЫ ПРИКЛАДНОЙ ИММУНОЛОГИИ

Тема 13

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия. Ознакомить студентов с техникой заражения лабораторных животных, целями и правилами их бактериологического исследования. Освоить методы определения вирулентности микроорганизмов и тестирования факторов патогенности бактерий.

Оборудование и материалы. Кроважной МПА в чашках Петри, стерильная плазма кролика (человека), культуры *E. coli*, трупы мышей, зараженных *E. coli*, белые мыши, морские свинки, кролики, стерильные шприцы, иглы, физиологический раствор.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

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

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

Перед заражением животных метят: кроликов и морских свинок — металлическими ушными номерами; мышей и крыс — раствором краски (фуксин, метиленовый синий и т. д.). Для удобства и безопасности работы животных фиксируют. Морских свинок помощник держит брюшком вверх так, чтобы средний палец левой руки находился на шее, а большой и указательный — у передних конечностей животного. Правой рукой придерживают задние конечности. Мышь берут одной рукой за кончик хвоста, другой — за кожную складку затылка и поворачивают в нужное положение. Крыс фиксируют корцангами, захватив складку кожи затылка, плотно прижимают голову к поверхности стола, другой рукой держат за хвост и поворачивают в нужное положение, оттягивают корцангом голову (рис. 51...53).

Методы заражения животных. При заражении используют только стерильные инструменты — шприцы, иглы, ланцеты, пинцеты и др.

С к а р и ф и к а ц и я (накожное заражение): на месте заражения предварительно выстригают шерсть и дезинфицируют кожу, затем скальпелем делают небольшие надрезы кожи (насечки) и в них втирают жесткой щеточкой исследуемый материал или бактериальную культуру.

В н у т р и к о ж н о е з а р а ж е н и е: пальцами левой руки оттягивают кожу и в образовавшуюся между ними кожную складку вводят кончик иглы. Объем вводимого материала не должен превышать 0,2 мл. Показатель правильного введения — припухлость размером с горошину.

П о д к о ж н о е з а р а ж е н и е: пальцами левой руки оттягивают кожу, в образовавшийся «кармашек» — складку вводят иглу шприца, затем его содержимое. Место заражения у кроликов — со стороны спины, несколько сбоку, у белых мышей и крыс — со спины к основанию хвоста. Объем вводимого материала не должен превышать для мышей 1 мл, для крыс, морских свинок — 10 мл, кроликов — 20...25 мл.

В н у т р и м ы ш е ч н о е з а р а ж е н и е: материал чаще вводят с внутренней поверхности бедра. Голубей и кур заражают

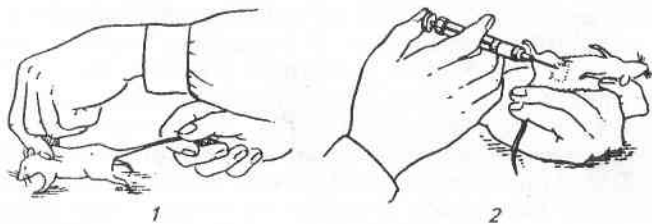


Рис. 51. Фиксация (1) и заражение (2) мыши при работе без помощника

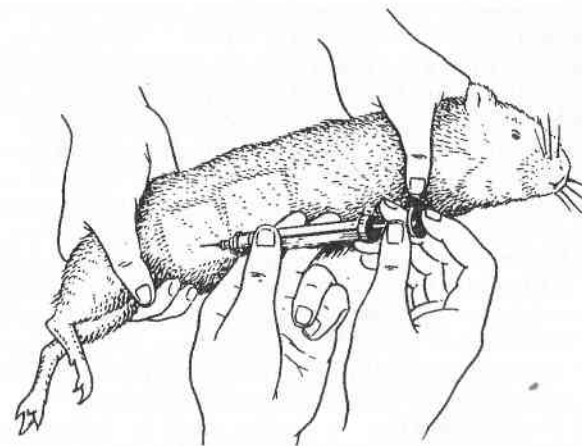


Рис. 52. Фиксация морской свинки руками

также и в грудную мышцу. Объем вводимого материала мышам 0,5 мл, морским свинкам и крысам по 3...5 мл, кроликам 5...8 мл, большие дозы следует вводить дробно в два-три места.

В н у т р и б р у ш и н н о е (интраперитонеальное) з а р а ж е н и е: животное фиксируют головой вниз, иглу шприца вводят в нижнюю треть живота, чуть отступя от белой линии. Доза не должна превышать 0,1...0,2 мл.

В н у т р и в е н н о е з а р а ж е н и е: исследуемый материал вводят кроликам в краевую вену уха, мышам и крысам — в вену хвоста. Перед заражением место инъекции протирают тампоном,

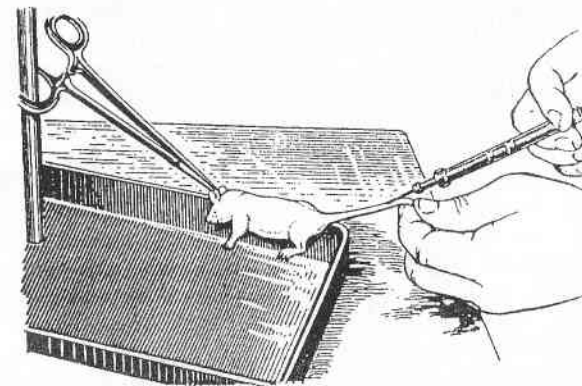


Рис. 53. Фиксация крысы руками без помощника

смоченным ксилолом или теплой водой, чтобы вызвать наполнение сосудов кровью.

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

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

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

Кроме того, животных заражают в переднюю камеру глаза.

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

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

Сначала вскрывают грудную полость. Учитывают патолого-анатомическую картину, записывают данные в журнале экспертизы. Поверхность сердца, легких, лимфатических узлов прижимают раскаленным шпательем, пастеровской пипеткой прокалывают в этом месте орган, насасывают небольшое количество крови (тканевой пульпы) и высевают ее на питательные среды, соблюдая стерильность (рис. 54).

Затем вскрывают брюшную полость. Пинцетом оттягивают вверх брюшную стенку и ножницами разрезают ее от диафрагмы до анального отверстия (важно не повредить кишечник!). Осмат-

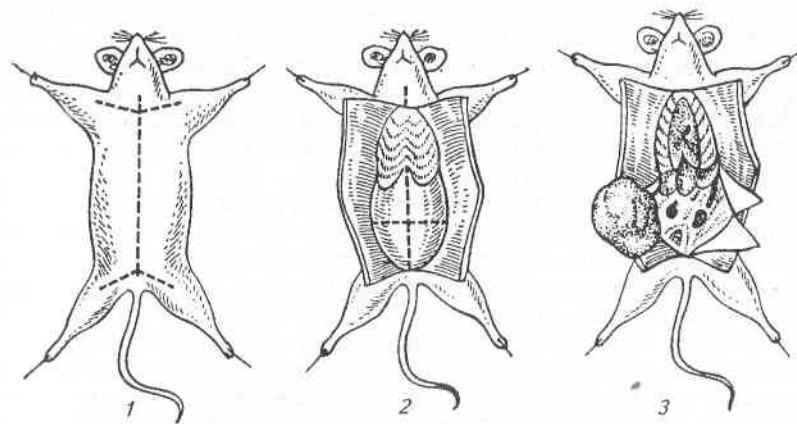


Рис. 54. Вскрытие мыши:

1 — дезинфекция, разрез кожи; 2 — отслаивание кожи от подкожной клетчатки и мускулатуры; 3 — вскрытие грудной и брюшной полостей

ривают органы брюшной полости, отмечая размеры, цвет и консистенцию паренхиматозных органов, состояние кишечника, наличие экссудата в брюшной полости и его характер. Также после прижигания поверхности делают посевы из печени, почек, селезенки, лимфатических узлов, в случае необходимости из содержимого кишечника и других органов. Параллельно из тканей органов готовят мазки-отпечатки для микроскопического исследования: стерильными ножницами отрезают кусочек органа и к поверхности разреза несколько раз отдельными участками прикладывают предметное стекло; препарат подсушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают, микроскопируют.

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

Определение вирулентности и токсигенности микроорганизмов. В повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности микроорганизма; при оценке биопрепаратов необходимы количественные характеристики вирулентности микроорганизма, взятого для заражения животного.

Вирулентность (токсигенность) микроба измеряют в специальных условных единицах: абсолютная летальная доза (Dcl —

dosis certae letalis) вызывает гибель 100 % зараженных животных; 50%-я летальная доза (LD_{50}) — 50 % зараженных животных; 50%-я инфицирующая доза (ID_{50}) вызывает заболевание 50 % зараженных животных. LD_{50} и ID_{50} — наиболее точные показатели, поскольку отражают чувствительность к возбудителю (токсину) большинства взятых в опыт животных, а D_{CI} показывает чувствительность наиболее устойчивых особей.

Для расчета LD_{50} исследуемой культуры микроорганизма используют один из приведенных методов. Готовят суспензию бактерий с известным содержанием микробных клеток в единице объема. Затем делают последовательные (2, 5, 10-кратные) разведения суспензии на стерильном физиологическом растворе и равные объемы каждого разведения вводят (подкожно, внутривентриально и т. д.) чувствительным лабораторным животным. Если определяют летальный эффект, то учитывают количество погибших животных и рассчитывают LD_{50} . Поскольку обычно ни одна из доз возбудителя не приводит к гибели строго 50 % зараженных животных, LD_{50} определяют статистическими методами.

Расчет LD_{50} по методу Рида и Менча. Например, из суспензии с концентрацией клеток 10^9 /мл были приготовлены десятикратные разведения 10^{-2} , 10^{-3} и т. д. По 0,5 мл каждого разведения ввели внутривентриально шести белым мышам. Результаты заражения показаны в таблице 3.

3. Расчет LD_{50} по методу Рида и Менча

| Разведение исходной суспензии бактерий | Заражено мышей | Фактические данные | | Кумулятивные данные | | | |
|--|----------------|--------------------|--------|---------------------|--------|-------------------------------|----------------|
| | | Пало | Выжило | Пало | Выжило | Отношение павших к зараженным | Летальность, % |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| $1:10^2 (10^{-2})$ | 6 | 6 | 0 | 14 | 0 | 14:14 | 100 |
| $1:10^3 (10^{-3})$ | 6 | 5 | 1 | 8 | 1 | 8:9 | 88,8 |
| $1:10^4 (10^{-4})$ | 6 | 2 | 4 | 3 | 5 | 3:8 | 37,5 |
| $1:10^5 (10^{-5})$ | 6 | 1 | 5 | 1 | 10 | 1:11 | 9 |
| $1:10^6 (10^{-6})$ | 6 | 0 | 6 | 0 | 16 | 0:16 | 0 |

В графах 3 и 4 приведены фактические цифры гибели животных, зараженных различными дозами возбудителя. В графах 5 и 6 указаны так называемые кумулятивные данные. Например, в графе 5 напротив дозы 10^{-2} стоит число 14, оно получено из предположения, что при заражении всех мышей одной этой дозой (максимальной) пали бы все животные, которые погибли после введения меньших доз (10^{-3} , 10^{-4} и т. д.). Поэтому мы имеем формальное право суммировать напротив дозы 10^{-2} в графе 5 всех мышей, павших от этой и меньших доз: $6 + 5 + 2 + 1 = 14$ мышей. Аналогичным образом определяем кумулятивные данные в графе 5 напротив каждой дозы.

Таким же образом определяем кумулятивные данные для всех доз по графе 6 (выжившие животные). Например: при заражении мышей минимальной дозой 10^{-6} выжило 6 мышей и, безусловно, выжили бы все животные, которые остались живы после заражения большей дозой бактерий. Исходя из этого, кумулятивный показатель при дозе 10^{-6} составляет: $6 + 5 + 4 + 1 = 16$ мышей. Аналогичным образом определяем это число для остальных доз.

На следующем этапе, основываясь на кумулятивных данных, рассчитывают процент гибели мышей при заражении каждой дозой микроорганизма. Как видно, ни одна доза не приводит к гибели 50 % мышей, и этот показатель рассчитывают математически.

В нашем случае LD_{50} находится между дозами 10^{-3} и 10^{-4} , немного ближе к 10^{-4} . Маленькую разницу (от 37,5 до 50 %) соотносим с большей (от 88,8 до 37,5 %) и получим фактор пропорциональности, на который доза 10^{-4} отличается от LD_{50} . Этот фактор умножаем на логарифм разведения, который в нашем примере равен 1,0 (фактор = 10, $\lg 10 = 1,0$). Эту величину вычитаем из 10^{-4} и получаем LD_{50} :

$$\frac{50 - 37,5}{88,8 - 37,5} = 0,243 \text{ (фактор пропорциональности);}$$

$$0,243 \cdot 1 = 0,243; \quad 4,0 - 0,243 = 3,756.$$

Следовательно, $LD_{50} = 10^{-3,756}$. Чтобы найти разведение бактериальной суспензии, соответствующее вычисленному показателю LD_{50} , используют логарифмические таблицы. Антилогарифм и одновременно искомое разведение составляют 1:5747. Для заражения животных использовали суспензию бактерий с концентрацией клеток 10^9 /мл в объеме 0,5 мл, следовательно, $LD_{50} = 10^9 \cdot 0,5/5747 = 87\,000$ микробных клеток.

Расчет LD_{50} по методу Кербера. Для получения точных результатов необходима положительная ответная реакция в диапазоне от 100 до 0 %.

Рассмотрим пример расчета на основании тех же данных, которые приведены в таблице 3.

| Разведение исходной суспензии бактерий | Отношение числа павших животных к числу зараженных | Константа реакции |
|--|--|-------------------|
| 10^{-2} | 6/6 | 1,00 |
| 10^{-3} | 5/6 | 0,83 |
| 10^{-4} | 2/6 | 0,33 |
| 10^{-5} | 1/6 | 0,16 |
| 10^{-6} | 0/6 | 0,00 |
| | | Итого 2,32 |

Сумму констант (2,32) рассматривают как характеристику процесса в целом. Логика дальнейших рассуждений следующая.

Из суммы 2,32 вычитаем значение константы, соответствующей 50%-й реакции (0,5): $2,32 - 0,5 = 1,82$. На степень 1,82 показатель LD_{50} отличается от 100%-й реакции.

Число 1,82 умножаем на значение логарифма интервала между разведениями исходной бактериальной суспензии, а поскольку разведения десятикратные, то получим

$$1,82 \cdot 1,00 = 1,82.$$

Далее суммируем 1,82 с показателем степени разведения суспензии ($1/10^2$), при котором константа реакции равна 1,0: $1,82 + 2,0 = 3,82$, т. е. $LD_{50} = 10^{-3,82}$. Все это можно выразить следующей формулой:

$$LD_{50} = \lg 1/10^2 + \lg 10 (\Sigma - 0,5),$$

где $\lg 1/10^2$ — логарифм разведения с константой реакции 1,0; $\lg 10$ — логарифм интервала (кратность разведения может быть 2, 5 и т. д.); Σ — сумма констант реакций.

Используя таблицу антилогарифмов, показатель $10^{-3,82}$ переводят в абсолютную величину.

Выявление токсинов микроорганизмов. Обнаружение экзотоксинов лежит в основе лабораторной диагностики многих инфекционных заболеваний (ботулизма, энтеротоксемии овец и др.), а также микотоксикозов. В этих случаях материал, предположительно содержащий токсин, вводят (скармливают, наносят на поверхность кожи) чувствительным биологическим моделям (лабораторные, сельскохозяйственные животные и др.) и по их гибели, заболеванию, изменениям в органах и тканях судят о наличии токсина. Разработаны иммунологические методы идентификации токсинов (см. тему 19).

Кроме того, обнаружение токсинов и определение их количества необходимы для приготовления биопрепаратов. Например, иммунитет при ботулизме, энтеротоксемии в значительной мере антитоксический, присутствие токсина (в виде анатоксина) в вакцине определяет иммуногенность препарата. Поэтому необходимо точно определять количество токсина в культуральной жидкости. В этом случае устанавливают содержание токсина в 1 мл культуральной жидкости на чувствительных животных, считывая LD_{50} , например, по методу Кербера.

Выявление других факторов патогенности микроорганизмов. Заключение о патогенности микроорганизма делают как по результатам биопробы (прямое доказательство), так и по ряду признаков, косвенно свидетельствующих о патогенных свойствах выделенного микроба. Наиболее часто применяют следующие тесты.

Тест на плазмокоагулазу. Коагулаза — фермент бактерий (стафилококков), который в сочетании с некоторыми

компонентами сыворотки коагулирует плазму. Благодаря коагулазе вокруг стафилококковых поражений образуется фибриновый барьер, облегчающий персистенцию бактерий в тканях, кроме того, отложения фибрина на поверхности бактериальных клеток затрудняют их фагоцитоз.

Петлю бактериальной массы исследуемой культуры, снятой с поверхности агаровой среды, смешивают с 0,5 мл плазмы крови кролика (человека), не разведенной или разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 4, инкубируют при 37 °С, результаты учитывают через 4 и 24 ч. Положительная реакция — образование сгустка.

Тест на гиалуронидазу. Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту и, как следствие, деполимеризующий межклеточное вещество. Рассматривают как фактор инвазивности бактерий. Получение гиалуронового субстрата (из пупочных канатиков) — довольно сложная процедура. На практике удобнее использовать тест декапсуляции бактерий. В качестве субстрата в этом случае берут культуры бактерий, в капсульном веществе которых есть гиалуроновая кислота (*P. multocida* серовар А, *S. equi*).

На поверхность агара в чашке Петри дробно засевают культуру *P. multocida* или *S. equi*. Затем в виде линии высевают на поверхность среды культуру микроорганизма, у которого выявляют способность к синтезу гиалуронидазы. Чашки с посевами инкубируют при 37 °С 16...24 ч. Если исследуемый микроорганизм выделяет гиалуронидазу, то она диффундирует в толщу питательной среды и разрушает капсулу тест-микроба. При анализе посевов в косопрходящем пучке света колонии *S. equi* (*P. multocida*) вблизи «штриха» исследуемой культуры меньше по размеру, серого или голубого цвета в отличие от флуоресцирующих отдаленных колоний.

Тест на гемолизин. Бактериальные гемолизины — обширная группа веществ-мембранотоксинов, которые вызывают нарушение целостности мембраны эритроцитов и их лизис.

Исследуемую культуру уколом или дробно засевают в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посевай инкубируют при 37 °С 24 ч. Гемолизин, выделяемый растущей культурой бактерий, диффундирует в толщу агара и вызывает лизис эритроцитов, что проявляется в виде светлой (бета-гемолиз) или полупрозрачной (альфа-гемолиз) зоны вокруг колоний. Гемолитическую активность микроорганизма можно также определять его посевом в 1...5%-й кровяной бульон, который после культивирования выделяющего гемолизин микроба становится прозрачным за счет лизиса эритроцитов.

Тест на фибринолизин (стрептокиназу). Многие гемолитические стрептококки образуют стрептокиназу, которая активирует протеолитический фермент плазмы (плазминоген →

плазмин), этот фермент — фибринолизин растворяет коагулированную плазму.

Исследуемую культуру микроорганизма засевают в виде «бляшки» на агар с 12% цитрированной плазмы. Посевы инкубируют при 37 °С 23...24 ч. Положительный результат — появление зоны просветления вокруг колонии.

Тест на лецитиназу. Лецитиназа расщепляет гидролизом лецитин. Готовят желточный агар: пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза — 1 г, агар — 12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл. Устанавливают рН 7,2...7,4, стерилизуют при 121 °С 15 мин, охлаждают до 55 °С, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь разливают в чашки Петри.

Исследуемую культуру засевают дробно на желточный агар, культивируют при 37...38 °С 24...48 ч. Положительный результат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

Тест на ДНК-азу. Исследуемую культуру бактерий засевают «штрихом» на питательный агар с ДНК и культивируют при 37 °С 24 ч. Затем на поверхность среды с бактериальной культурой наливают 1 н. раствор соляной кислоты. Положительный результат — при гидролизе ДНК вдоль «штриха» культуры видна светлая зона.

Питательная среда с ДНК: в расплавленный МПА добавляют 10%-й раствор ДНК до конечной 0,2%-й концентрации, перемешивают компоненты, автоклавируют при 120 °С 15 мин и разливают в чашки Петри.

Тесты на другие ферменты. Как факторы патогенности можно рассматривать ферменты, катализирующие реакции с образованием токсических продуктов, например: уреазы гидролизует мочевины с образованием аммиака; декарбоксилаза декарбоксилирует аминокислоты с образованием аминов и т. д. Методы обнаружения этих ферментов изложены в теме 9.

Тест на адгезины. В адгезии бактерий принимают участие различные компоненты оболочки. Это свойство выявляют по способности исследуемого микроорганизма сорбироваться на различных эукариотических клетках (эритроциты, энтероциты) или других частицах (латекс). Еще один метод обнаружения адгезинов связан с их использованием в качестве антигенов в серологических реакциях. У эшерихий адгезивные свойства часто определяют по их способности агглютинировать эритроциты.

В лунки планшетов вносят по 50 мкл 4%-й суспензии отмытых эритроцитов морской свинки, 1%-й раствор D-маннозы, суспензию исследуемых бактерий с концентрацией клеток 10^9 /мл. Параллельно ставят реакцию в отсутствие маннозы. Результат учитывают через 30...60 мин. Положительная реакция — склеивание и оседание эритроцитов в виде «зонтика». Торможение агглюти-

нации маннозой обозначают как маннозочувствительную ГА (гемагглютинация), отсутствие ингибирования — как маннозорезистентную ГА.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Освоить методы заражения лабораторных животных.
2. Провести бактериологическое исследование трупа лабораторного животного.
3. По готовым цифровым данным рассчитать LD_{50} микроорганизма.
4. Ознакомиться с проявлением гемолитической, плазмокоагуляционной, гиалуронидазной активности микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Какими методами заражают лабораторных животных?
2. Каковы основные правила бактериологического исследования трупов животных?
3. С какой целью и какими методами рассчитывают LD_{50} микроорганизмов?
4. Какими методами определяют факторы патогенности микроорганизмов?

Тема 14

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА МАКРООРГАНИЗМА

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами тестирования факторов неспецифической резистентности и методами оценки иммунного статуса животного организма.

Оборудование и материалы. Культура *E. coli* на МПА стерильный МПБ, стерилизатор, шприцы и иглы, спиртово-водный раствор метиленового синего, нормальная и иммунная (противоэшерихиозная) кроличья сыворотка, стерильные пастеровские пипетки, 1%-й агар Дифко, ацетоновый порошок *M. lysodeicticus* (или культура), стерильные чашки Петри, кристаллический лизоцим, фосфатно-солевой буферный раствор с рН 7,2...7,4, эритроциты барана, стерильный физиологический раствор, веронал-мединаловый буферный раствор с рН 7,3...7,4, гемолизин, комплемент морской свинки, дистиллированная вода, фотоэлектроколориметр, пластины с результатами радиальной иммунодиффузии по определению иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови, калибровочная кривая для определения содержания иммуноглобулинов разных классов; препараты для подсчета Е—РОК и ЕАС—РОК.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Методы определения факторов неспецифической резистентности макроорганизма. Защиту макроорганизма от возбудителей инфекционных болезней обеспечивает не только иммунная система, но и механизмы неспецифического порядка: непроницаемость слизистых и кожных покровов, фагоцитоз, бактерицидное действие лизоцима, а также гуморальные факторы: комплемент, пропердин и др. Все эти механизмы (факторы неспецифической резистентности) представляют собой первую линию противoinфекционной защиты, поскольку при первичном контакте с возбудителем иммунный ответ развивается только спустя некоторое время.

Количественное определение лизоцима в сыворотке крови. Лизоцим — гидролитический фермент, расщепляющий высокомолекулярные полисахариды бактерий (пептидогликан), находится в тканях, секретах, экскретах (за исключением пота и мочи), действует бактерицидно на многие бактерии. Присутствие и активность лизоцима определяют по его способности вызывать лизис бактерии *Micrococcus lysodeiaticus*.

Готовят 1%-й агаровый гель (Дифко) на $1/15$ М фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР). В расплавленный агар температурой 60...70 °С вносят ацетоновый порошок биомассы *M. lysodeiaticus* из расчета 10 мг на 100 мл геля. Компоненты перемешивают и разливают в чашки Петри (толщина слоя 4 мм). В застывшем агаре делают лунки диаметром 5 мм.

Параллельно определяют активность стандартного лизоцима, кристаллизованного из яичного белка. Для этого лизоцим разводят в $1/15$ М ФСБР, чтобы получить разведения с концентрацией 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 40 и 70 мг/мл. По 0,05 мл каждого разведения лизоцима вносят в лунки. Чашки Петри выдерживают 48 ч во влажной камере при 37 °С и измеряют диаметр зоны лизиса *M. lysodeiaticus* вокруг лунок.

По полученным данным строят калибровочную кривую, откладывая на осях координат значения концентрации лизоцима и диаметра зоны лизиса.

Сыворотку крови разводят в ФСБР в соотношении 1 : 5, вносят по 0,03 мл в лунки и далее поступают, как при определении активности стандартного лизоцима. Измерив диаметр зоны лизиса, по калибровочной кривой вычисляют содержание лизоцима в исследуемой пробе.

Количественное определение комплемента в сыворотке крови. Комплемент (С) представляет собой сложную систему главным образом неактивных белков крови. Процесс их активации (по классическому пути) запускается образованием комплекса антиген — антитело (АГ — АТ) и происходит в виде цепной реакции: комплекс АГ · АТ + С₁ + С₄ + С₂ + С₃ + С₅ + С₆ + С₇ + С₈ + С₉. В процессе

активации образуется литический комплекс, который делает мембрану клетки проницаемой, внутрь клетки осмотически поступает вода, в результате клетка набухает и лопается. Такое разрушение клеток (антигенов) под влиянием антител и комплемента получило название иммунного лизиса. Наиболее эффективно комплемент действует на бактериальные клетки в сочетании с лизоцимом. Кроме того, бактериальные клетки (антигены) после взаимодействия с антителами и комплементом легче поглощаются фагоцитами.

Количество комплемента в крови (сыворотке крови) определяют в реакции иммунного лизиса с использованием эритроцитов барана и гемолизина в качестве антител к эритроцитам барана. Приготовление этих компонентов изложено в теме 17. Эритроциты барана, обработанные гомологичными антителами и чувствительные в таком состоянии к литическому действию комплемента, называют гемолитической системой. Количество комплемента измеряют в 50 % гемолитических единицах (СН₅₀). За единицу комплемента принимают такое его количество в объеме 0,5 мл, которое за 30 мин при 37 °С обуславливает лизис 50 % эритроцитов в 0,5 мл гемолитической системы (5%-я суспензия эритроцитов барана в веронал-мединаловом буферном растворе с рН 7,3...7,4 + гемолизин в тройном титре).

Исследуемую сыворотку в возрастающих дозах разливают по пробиркам (например, 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,08; 0,1 мл), добавляют ФСБР до 0,5 мл, вносят во все пробирки по 0,5 мл стандартизированной гемсистемы. Одновременно ставят контроль на резистентность эритроцитов (0,5 мл ФСБР + 0,5 мл гемсистемы). Пробирки встряхивают и выдерживают при 37 °С 30 мин, охлаждают при 2...4 °С 10 мин, центрифугируют при 3000 мин⁻¹ 15...20 мин, насадочную жидкость колориметрируют и по коэффициенту экстинкции определяют процент гемолиза при помощи заранее построенной калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят следующим образом: к 1 мл 5%-й суспензии эритроцитов добавляют 3 мл дистиллированной воды, эритроциты при этом полностью лизируются (100%-й гемолиз). Из полученного лизата путем добавления буферного раствора готовят пробы с 10-, 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 90%-м гемолизом. На фотоэлектроколориметре определяют оптическую плотность каждой пробы (кювета шириной 1 мм, синий светофильтр), затем на оси абсцисс откладывают процент гемолиза, а на оси ординат — коэффициент экстинкции. СН₅₀ вычисляют по дозе сыворотки, дающей гемолиз, наиболее близкий к 50 %. Для этого используют специальную формулу (Крога) или, что проще, коэффициенты, рассчитанные по этой формуле (табл. 4).

Например, если исследуемая сыворотка в разведении 1 : 25 дает 30%-й лизис, то СН₅₀ в 1 мл составит $25 \cdot 0,844 = 21,1$ ед.

4. Коэффициенты, рассчитанные по формуле Крога

| Лизис, % | Коэффициент | Лизис, % | Коэффициент |
|----------|-------------|----------|-------------|
| 10 | 0,644 | 55 | 1,041 |
| 12 | 0,671 | 60 | 1,084 |
| 14 | 0,696 | 65 | 1,032 |
| 16 | 0,718 | 70 | 1,185 |
| 18 | 0,738 | 75 | 1,246 |
| 20 | 0,758 | 80 | 1,320 |
| 25 | 0,803 | 82 | 1,354 |
| 30 | 0,844 | 84 | 1,393 |
| 35 | 0,884 | 86 | 1,438 |
| 40 | 0,922 | 88 | 1,490 |
| 45 | 0,961 | 90 | 1,552 |
| 50 | 1,000 | | |

Демонстрация фагоцитоза бактерий. К фагоцитирующим клеткам относят полиморфноядерные лейкоциты крови. Поглощение микробной клетки фагоцитом может не сопровождаться гибелью микроорганизма (незавершенный фагоцитоз) или приводить к внутриклеточному перевариванию захваченных бактерий (завершенный фагоцитоз).

Белой мыши внутрибрюшинно сначала вводят 2 мл стерильного МПБ, через два-три часа — 0,5 мл культуры эшерихий. Спустя 20...40 мин шприцем из брюшной полости отбирают экссудат, делают мазки на предметном стекле, фиксируют спирт-эфиром, окрашивают метиленовым синим (экспозиция 2...3 мин). При микроскопировании можно наблюдать различные стадии фагоцитоза: поглощение, деструкцию (переваривание) клеток (рис. 55).

Методы оценки активности фагоцитирующих клеток. Для оценки активности фагоцитов используют следующие показатели: 1) фагоцитарный показатель — процент фагоцитирующих клеток от общего числа учтенных нейтрофильных лейкоцитов;

2) фагоцитарное число — среднее число микробных клеток, поглощенных одним лейкоцитом (характеризует интенсивность фагоцитоза).

Определение фагоцитарного показателя: в чистую стерильную цент-

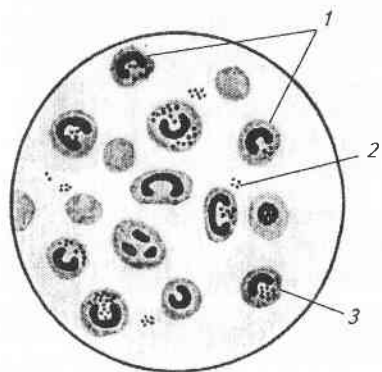


Рис. 55. Фагоцитоз стафилококков:

1 — фагоциты; 2 — свободные стафилококки; 3 — фагоцитированные стафилококки

рифужную пробирку вносят 0,2 мл 2%-го раствора цитрата натрия, 0,1 мл крови, взятой у морской свинки или кролика, и 0,05 мл суспензии убитых нагреванием бактерий *S. epidermidis*, *E. coli* или др. (концентрация $0,5 \cdot 10^9$ клеток по оптическому стандарту мутности). Компоненты перемешивают и выдерживают при 37...38 °C 30 мин, затем центрифугируют при 2500...3000 мин⁻¹ 15...20 мин до образования прозрачного слоя плазмы, слоя эритроцитов и тонкого сероватого среднего слоя лейкоцитов. Осторожно отсасывают плазму, пипеткой берут средний слой, делают три—пять мазков и окрашивают по методу Романовского—Гимзы. Препарат микроскопируют, подсчитывают не менее 100 нейтрофильных лейкоцитов и определяют среди них число (%) фагоцитирующих.

Определение фагоцитарного числа: в мазках, которые были приготовлены для определения фагоцитарного показателя, подсчитывают 100 нейтрофильных лейкоцитов и суммарное количество захваченных ими бактериальных клеток, затем определяют фагоцитарное число. Например, 100 лейкоцитов поглотили 500 бактериальных клеток, следовательно, фагоцитарное число равно $500 : 100 = 5$.

Определение опсоно-фагоцитарного индекса. Интенсивность фагоцитоза повышается благодаря антителам — опсонинам, взаимодействующим с микробными клетками. Чтобы определить опсоно-фагоцитарный индекс, сравнивают активность фагоцитов в нормальной и исследуемой (иммунной) сыворотках.

Пастеровской пипеткой набирают на высоту капилляра около 2 см сначала суспензию бактериальных клеток ($0,5 \cdot 10^9$ /мл), затем лейкоцитов и, наконец, исследуемую сыворотку. На предметном стекле компоненты перемешивают при помощи пипетки, затем вновь набирают в капилляр, конец которого запаивают. Капилляр помещают в термостат при 37 °C на 30 мин. После инкубирования смесь выливают на предметное стекло, готовят мазок и окрашивают его метиленовым синим (1 мл насыщенного спиртового раствора на 30 мл дистиллированной воды).

Аналогичным образом готовят препарат с нормальной (контрольной) сывороткой. Оба препарата микроскопируют, просматривают 100 нейтрофильных лейкоцитов, определяют количество фагоцитированных бактерий, рассчитывают фагоцитарное число в каждой сыворотке и затем опсоно-фагоцитарный индекс исследуемой сыворотки. Например, в 100 лейкоцитах нормальной сыворотки фагоцитировано 200 бактерий, следовательно, фагоцитарное число $200 : 100 = 2$. В 100 лейкоцитах исследуемой иммунной сыворотки захвачено 500 бактерий и фагоцитарное число $500 : 100 = 5$.

Опсоно-фагоцитарный индекс показывает, во сколько раз процесс фагоцитоза в иммунной сыворотке интенсивнее, чем в

нормальной. Его вычисляют делением фагоцитарного числа иммунной сыворотки на фагоцитарное число нормальной сыворотки. В приведенном примере опсоно-фагоцитарный индекс составит $5,0 : 2,0 = 2,5$.

Методы оценки иммунного статуса макроорганизма. Работа иммунной системы, как и любой другой системы организма, может нарушаться, что неизбежно повысит восприимчивость животного к инфекционным заболеваниям.

Методы оценки Т-системы иммунитета (клеточный иммунитет). Из числа существующих методов оценки Т-иммунитета наиболее известны следующие.

Метод «спонтанных розеток» (Е—РОК). Т-Лимфоциты несут на своей поверхности рецепторы, реагирующие с мембранными структурами эритроцитов барана. После сорбции эритроцитов Т-клетки приобретают форму «розетки», что позволяет выявлять их в популяции лимфоцитов. Реакцию проводят в три этапа.

Выделение лимфоцитов барана: в центрифужную пробирку наливают 2 мл разделяющего раствора, состоящего из 9%-го водного раствора фиколла и визотраста-370, доведенного до плотности 1,077 г/мл (соотношение 8:2). Затем на разделяющий раствор осторожно наслаивают 2...4 мл крови с гепарином (100 МЕ/мл), разведенной средой Игла в соотношении 1:2...1:4. Смесь центрифугируют при 600g и температуре 20 °С. Лимфоциты, сконцентрированные в виде беловатого слоя над разделяющим раствором, отсасывают пастеровской пипеткой и отмывают средой Игла (при 600g — 10 мин два раза, 200g — 10 мин один раз).

Инкубация: средой Игла концентрацию лимфоцитов доводят до $3 \cdot 10^6$ /мл. Готовят суспензию эритроцитов барана, эритроциты отмывают 0,15 М раствором хлорида натрия (три раза), затем из них готовят 0,5%-ю суспензию в среде Игла. Далее смешивают по 0,5 мл суспензии лимфоцитов и эритроцитов, смесь центрифугируют при 200g 5 мин и оставляют при 4 °С на 18 ч.

Учет реакции: осторожно покачивая пробирку, ресуспендируют осадок (не перемешивая), каплю суспензии вносят в счетную камеру и исследуют методом фазово-контрастной микроскопии. Просматривают не менее 200 лимфоцитов и подсчитывают те клетки, к поверхности которых прикреплено более трех эритроцитов (рис. 56), — естественные розеткообразующие клетки (Е—РОК).

Технология выращивания животных отражается на их физиологическом состоянии и на количестве Т- и В-клеток в частности (табл. 5).

Выявление Т-хелперов и Т-супрессоров. Т-хелперы и Т-супрессоры несут на своей поверхности специфические антигены, которые можно обнаружить при помощи мы-

5. Показатели Т- и В-систем иммунитета у поросят комплексов промышленного типа и обычных хозяйств (Р. Я. Пустовар, 1991)

| Показатель | Значение показателя (%) для поросят в хозяйстве | |
|---|---|---------|
| | крупном | обычном |
| Абсолютное количество Т-лимфоцитов ($\cdot 10^9$) | 1,947 | 2,631 |
| Е—РОК | 16,5 | 30 |
| Абсолютное количество В-лимфоцитов ($\cdot 10^9$) | 1,465 | 1,239 |
| ЕАС—РОК | 12,4 | 14,9 |

шинных моноклональных антител (см. тему 20) в реакции непрямой иммунофлуоресценции (см. тему 18). Лимфоциты, связавшие моноклональные антитела, светятся по периферии клеток, что позволяет определить их количество при микроскопическом исследовании.

Методы оценки В-системы иммунитета (гуморальный иммунитет). Включают в себя оценку В-лимфоцитов (общее содержание в крови, анализ антигенных детерминант) и вырабатываемых ими антител.

Количественное определение иммуноглобулинов разных классов методом радиальной иммунодиффузии (по Манчини). Количество и соотношение иммуноглобулинов отдельных классов в биологических жидкостях отражают состояние В-системы. Методика постановки реакции изложена согласно Ю. Н. Федорову (1981). Иммунную сыворотку

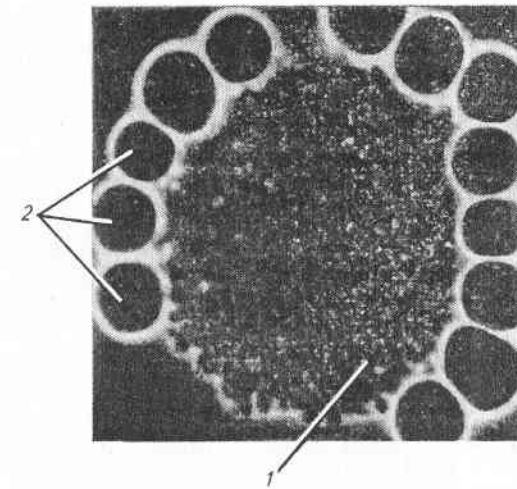


Рис. 56. Феномен розеткообразования:

1 — лимфоцит; 2 — эритроциты на поверхности лимфоцита

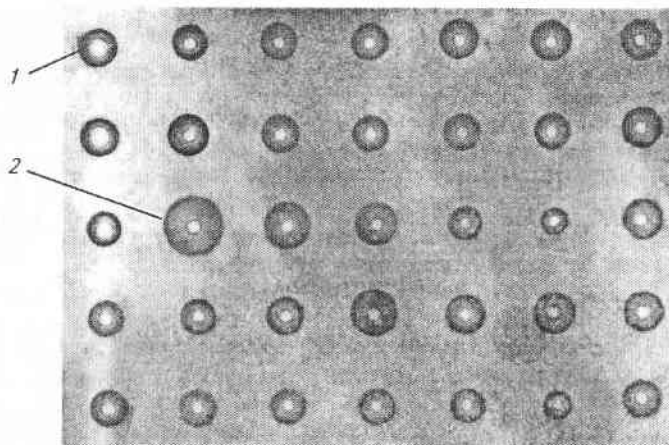


Рис. 57. Радиальная иммунодиффузия. Определение IgA:

1 — проба с небольшим содержанием IgA (малая площадь преципитации);
2 — проба с большим содержанием IgA (большая площадь преципитации)

против антител определенного класса (IgG, IgM, IgA) вносят в расплавленный агаровый гель. После застывания агара антитела в нем равномерно распределены. Внесенный в лунку исследуемый материал (антиген) радиально диффундирует в толщу геля. Поскольку концентрация антител везде одинакова, то в результате реакции антиген — антитело в зоне эквивалентности образуются не полосы преципитации, а кольцо преципитации вокруг лунки с антигеном (рис. 57). Диаметр кольца преципитации прямо пропорционален концентрации антигена в исследуемой жидкости.

В предварительных опытах определяют оптимальное (рабочее) разведение антисывороток к иммуноглобулинам каждого класса. В каждом опыте устанавливают количество иммуноглобулинов в стандартной сыворотке и по отношению к ней определяют количество иммуноглобулинов в исследуемом материале.

Используют 3%-й агар Дифко на веронал-медианоловом буфере рН 7,3...7,4 (мединал — 35,4 г, веронал — 5,25 г, дистиллированная вода — до 1000 мл). В бактериологической пробирке смешивают по 5 мл расплавленного агара и антисыворотки. Берут два стекла размером 9×12 см, на одно из них помещают П-образную рамку, сверху кладут второе стекло. Толщина рамки составляет 1 мм. В щель между стеклами заливают смесь агара и антисыворотки и оставляют в вертикальном положении до застывания агара на 15...20 мин. Затем удаляют одно из стекол и рамку.

В агаре пробойником вырезают лунки диаметром 2 мм (5 рядов по 7 лунок в каждом). В лунки первого ряда вносят разведения стандартной сыворотки, в остальные — исследуемые пробы по 1 мкл. Пластинку выдерживают во влажной камере 24 ч (IgG, IgA) или 48 ч (IgM).

Строят калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывают значения диаметров колец преципитации разведенной стандартной сыворотки, на оси ординат — значения концентраций иммуноглобулинов (% или мг/мл). Измеряют диаметр колец преципитации в пробах и по калибровочной кривой устанавливают концентрацию соответствующего иммуноглобулина.

Количество иммуноглобулинов разных классов в биологических жидкостях варьирует в широких пределах (табл. 6).

6. Содержание иммуноглобулинов у крупного рогатого скота и свиней (Л. И. Ефанова, 1995)

| Вид животного | Класс иммуноглобулинов | Содержание иммуноглобулинов, мг/мл | | |
|----------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------|-----------|
| | | Сыворотка крови | Молозиво (первое) | Молоко |
| Крупный рогатый скот | G | 12...13 | 37...77 | 0,38 |
| | M | 2,5 | 5 | 0,04 |
| | A | 0,3...0,5 | 4,4 | 0,05 |
| Свинья | G | 17...29 | 30...70 | 1...3 |
| | M | 1...5 | 3...3,2 | 0,3...0,9 |
| | A | 2 | 10 | 5 |

Все методы определения В-лимфоцитов в крови основаны на выявлении на поверхности В-лимфоцита структур, специфических только для В-клеток: рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, рецепторы к C₃-фракции комплемента, иммуноглобулиновые рецепторы, а также специфические В-антигены.

Метод розеткообразования (ЕАС—РОК): эритроциты барана обрабатывают антителами гемолизина, затем комплементом. Образуется комплекс АГ—АТ—С, содержащий компонент комплемента С₃. Далее смешивают лимфоциты животного и обработанные эритроциты барана. Эритроциты за счет присутствующих на их поверхности молекул С₃ избирательно сорбируются на В-лимфоцитах, образуя «розетки».

Другие методы основаны на выявлении рецепторов к Fc-фрагментам иммуноглобулинов и иммуноглобулиновых детерминант на поверхности В-клеток. Рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулинов способен связывать агрегированный γ-глобулин, меченный флуорохромом, что можно в последующем установить при помощи флуоресцентного анализа.

Используя меченные флуорохромом антиглобулиновые сыворотки или антисыворотки против иммуноглобулинов отдельных классов, например моноклональные антитела (см. тему 21), мож-

но определить общее содержание В-клеток и дифференцировать клетки, несущие IgG-, IgA-, IgM-детерминанты.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с фагоцитозом методом микроскопии мазков из перитонеального экссудата мышей после введения в брюшную полость культуры эшерихий.

2. Определить опсоно-фагоцитарный индекс иммунной сыворотки против *E. coli*.

3. Оценить результаты титрования лизоцима в крови.

4. Ознакомиться с иммунным лизисом эритроцитов, определить содержание комплемента в сыворотке крови морской свинки.

5. Подсчитать количество Е-РОК лимфоцитов в готовых препаратах.

6. Оценить результаты реакции радиальной иммунодиффузии и рассчитать, используя готовую калибровочную кривую, содержание иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови.

Контрольные вопросы

1. Из каких стадий состоит процесс фагоцитоза?
2. Что такое фагоцитарное число, фагоцитарный показатель, опсоно-фагоцитарный индекс?
3. Как определяют активность комплемента?
4. Какими методами определяют количество иммуноглобулинов разных классов в биологических жидкостях?
5. Какие методы применяют для оценки В- и Т-систем иммунитета?

Тема 15

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ: АГГЛЮТИНАЦИИ (РА), НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА), КУМБСА (РК). ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Цель занятия. Ознакомить студентов с реакциями агглютинации, гемагглютинации и реакцией Кумбса, с техникой их постановки и учета результатов.

Оборудование и материалы. Культуры *E. coli* различной серогрупповой принадлежности на МПА, О-агглютинирующие диагностические эшерихиозные сыворотки, бруцеллезный роз-бенгал антиген, положительная бруцеллезная сыворотка, планшеты с результатами титрования иммунной сыворотки в РНГА, единый бруцеллезный антиген, мерные пипетки.

Серологические реакции рассмотрены последовательно в пяти темах (№ 15...19).

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Взаимодействие микробного антигена и антител носит строго специфический характер и направлено в животном организме на нейтрализацию возбудителя и его токсинов. Взаимодействие антигена и антител *in vitro* при определенных условиях сопровождаются видимые феномены (агглютинация, преципитация, иммунный лизис), что позволяет использовать АГ—АТ-реакции, получившие название серологических (лат. *serum* — сыворотка), в практических целях. Биофабрики выпускают антигены и иммунные сыворотки (антитела) известной специфической направленности (диагностические). При помощи таких сывороток в серологических реакциях можно идентифицировать неизвестный микроорганизм или, применяя известный антиген, обнаружить в организме антитела, синтезированные в ответ на внедрение возбудителя, и таким образом поставить диагноз (серологическая диагностика). Кроме того, серологические реакции можно использовать для оценки интенсивности иммунного ответа после вакцинации или перенесенной инфекционной болезни.

Реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации и Кумбса основаны на взаимодействии *in vitro* корпускулярных антигенов с антителами и способности образовавшихся комплексов выпадать в осадок. В качестве корпускулярных антигенов используют бактериальные клетки или растворимые антигены, экстрагированные из микроорганизмов и сорбированные на корпускулах носителей: эритроцитах, частицах латекса и т. д.

Антигенные детерминанты корпускулярных антигенов специфически взаимодействуют с гомологичными антителами (специфическая, невидимая фаза реакции), а затем комплексы антиген — антитело образуют крупные, видимые невооруженным глазом конгломераты, которые выпадают в осадок — агглютинат (неспецифическая, видимая фаза реакции). Антигены и антитела взаимодействуют лишь в присутствии электролита (в 0,8%-м растворе хлорида натрия).

Реакция агглютинации (РА). Разработано несколько вариантов реакции агглютинации, различающихся по методическому исполнению и цели исследования.

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

Учет результатов: в контрольной пробе изменения должны отсутствовать. При специфическом соответствии культуры бактерий иммунной сыворотке появляются хлопья агглютината (положительный результат), в случае отсутствия феномена агглютинации делают заключение о том, что исследуемая культура бактерий не соответствует иммунной сыворотке.

2. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови рассмотрим на примере роз-бенгал пробы, применяемой при серодиагностике бруцеллеза. На предметное стекло крови наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (окрашенные розовым-бенгалским клетки бруцелл). Компоненты тщательно перемешивают покачиванием стекла и через 4 мин учитывают результат.

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

Пробирочная РА. 1. Обнаружение антител в сыворотке крови рассмотрим на примере РА для серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Схема постановки опыта приведена в таблице 7. Общий объем компонентов реакции 1 мл.

7. Схема постановки пробирочной РА для обнаружения антител в сыворотке крови

| Компонент реакции | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | | |
|---|---|------------------|------------------|---|---------|-------------------------|
| | 1-й (исходное разведение и контроль антигена) | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й (контроль антигена) |
| Физиологический раствор | 2,4 | — | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Исследуемая сыворотка крови | 0,1 | 0,5 из 1-й проб. | 0,5 из 1-й проб. | Последовательный перенос по 0,5 мл, начиная с 3-й проб. | | — |
| Полученное разведение Бруцеллезный антиген, 10 ⁹ кл/мл | 1 : 25 | 1 : 25 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 0,5 |
| Конечное разведение | 1 : 25 | 1 : 50 | 1 : 100 | 1 : 200 | 1 : 400 | |

Перемешивают встряхиванием.
Инкубирование при 37...38 °С 18...20 ч

*Из 5-й пробирки удаляют 0,5 мл жидкости перед добавлением антигена.

Одновременно по аналогичной схеме исследуют заведомо положительную и отрицательную сыворотки (положительный и отрицательный контроли).

Учет результатов начинают с контрольных пробирок — не должно быть спонтанной (неспецифической) агглютинации в 6-й

пробирке (контроль антигена) и хлопьев осадка в 1-й пробирке (контроль сыворотки). В остальных пробирках наличие и интенсивность агглютинации учитывают визуально и оценивают в крестах: 1) (++++) — полная агглютинация — хорошо выраженный осадок и полное просветление жидкости (агглютинировало 100 % антигена); 2) (+++) — неполная агглютинация с хорошо выраженным осадком и со слабой опалесценцией жидкости (агглютинировало 75 % антигена); 3) (++) — частичная агглютинация с небольшим осадком, надосадочная жидкость мутная (агглютинировало 50 % антигена); 4) (+) — очень небольшой осадок, жидкость непрозрачная (агглютинировало 25 % антигена); 5) (—) — отсутствие агглютинации, осадка нет, жидкость мутная.

За положительный результат принимают агглютинацию минимум на два креста. Максимальное разведение исследуемой сыворотки крови, обеспечивающее агглютинацию минимум на два креста или более, называют титром сыворотки. Титр сыворотки отражает количественное содержание антител в крови исследуемого животного.

8. Учет результатов РА для обнаружения антител в сыворотке крови

| Сыворотка крови | Номера пробирок (разведение сыворотки) | | | | | |
|--------------------------|--|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | 1 (контроль сыворотки) | 2 (1 : 50) | 3 (1 : 100) | 4 (1 : 200) | 5 (1 : 400) | 6 (контроль антигена) |
| Исследуемая | — | ++++ | ++++ | +++ | + | — |
| Положительная (контроль) | — | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — |
| Отрицательная (контроль) | — | — | — | — | — | — |

Из приведенного примера (табл. 8) видно, что антиген специфичен, так как отсутствует спонтанная агглютинация с физиологическим раствором и нормальной (отрицательной) сывороткой, и активен — взаимодействует с заведомо положительной сывороткой. Следовательно, можно учитывать результаты РА с исследуемой сывороткой крови. Титр исследуемой сыворотки (титр антиген) в данном случае составляет 1 : 200.

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

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

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

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

Например, если культура *E. coli* дает в РА на стекле положительный результат одновременно с иммунными сыворотками против нескольких О-серогрупп, ее испытывают как антиген с теми же сыворотками уже в пробирочной РА и относят к той О-серогруппе, с сывороткой которой она дает максимальные титры (см. тому 29).

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА). Данную реакцию относят к серологической реакции осадочного типа. В ней используют растворимые микробные антигены, сорбированные на эритроцитах как носителях (антигенный диагностикум), или сорбированные на эритроцитах антитела известной иммунной сыворотки (антительный диагностикум). Антигенные диагностикумы применяют для серологической диагностики, антительные — для обнаружения антигенов в исследуемом материале.

Приготовление антигенных диагностикумов. Дефибрированную кровь отмывают ФСБР (рН 7,2) три раза. Для стабилизации (фиксации) эритроциты обрабатывают формальдегидом, глутаровым или акриловым альдегидом. Наиболее распространена формалинизация эритроцитов: 50%-ю суспензию эритроцитов смешивают с 50%-м раствором формалина в соотношении 1 : 1, выдерживают, периодически встряхивая, при 37 °С 2 ч и затем отмывают ФСБР три раза.

Эритроциты легко сорбируют на своей поверхности полисахариды, а после обработки танином и белки. Танинизацию проводят, смешивая 2,5%-ю суспензию эритроцитов и раствор танина (1 : 20 000) в соотношении 1 : 1 с последующим выдерживанием при 37 °С в течение 15 мин. Затем эритроциты отмывают ФСБР (три раза) и доводят концентрацию до исходной. Для сенсibilизации 1 мл 2,5%-й взвеси отмытых таннизированных эритроцитов объединяют с 1 мл антигена и 4 мл ФСБР (рН 6,4) и выдерживают при 37 °С 2 ч. После сенсibilизации эритроциты отмывают три раза и суспендируют в ФСБР (рН 7,2), который содержит 1% нормальной кроличьей сыворотки, обеспечивающей стабильность суспензии. Следует отметить, что оптимальное количество антигена для сенсibilизации эритроцитов определяют опытным путем в каждом случае.

Обнаружение антител в сыворотке крови. Сыворотку крови перед исследованием инактивируют в водяной бане при 56 °С

30 мин и проверяют на наличие антител к антигенам собственно эритроцитов. Для удаления антиэритроцитарных антител исследуемую сыворотку крови предварительно адсорбируют несенсибилизированными эритроцитами.

РНГА на стекле применяют для диагностики пуллороза — тифа птиц (качественная кровяная реакция непрямой гемагглютинации — ККРНГА). На сухое обезжиренное стекло глазной пипеткой наносят антиген и свежую кровь (в соотношении 1 : 1), взятую из гребня или подкрыльцовой вены птицы, и смешивают, покачивая стекло. Реакцию считают положительной при выпадении в течение двух минут в смеси крови с антигеном хлопьев коричневого цвета. Параллельно ставят контроли с положительной и отрицательной сыворотками.

Пробирочная РНГА рекомендована для серологической диагностики многих инфекционных болезней. Например, для диагностики сальмонеллез используют количественную РНГА. Эритроцитарный антиген содержит О-антигены сальмонелл. Исследуемую сыворотку разводят физиологическим раствором в полистироловых планшетах в объеме 0,5 мл от разведения 1 : 100 до 1 : 800. Затем в каждую лунку вносят 0,25 мл диагностикума. Компоненты перемешивают покачиванием планшета и выдерживают в термостате при 37 °С 2...2,5 ч. Результат РНГА оценивают в крестах (рис. 58): 1) (++++) — все эритроциты агглютинированы и в виде «зонтика» покрывают дно лунки; 2) (+++) — агглютинированы почти все эритроциты. На фоне «зонтика» сформировано малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов; 3) (++) или (+) — «зонтик» плохо выражен, заметен осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде кольца; 4) (—) — эритроциты не склеены и осели на дно в виде узкого колечка с ровными краями либо в виде пункта или колечка.

Параллельно ставят контроли с заведомо положительной и отрицательной сыворотками.

Реакция Кумбса (РК). Данная серологическая реакция также основана на феномене агглютинации. Предназначена для выявления так называемых «неполных» антител, у которых только один активный центр, и по этой причине они могут специфичес-

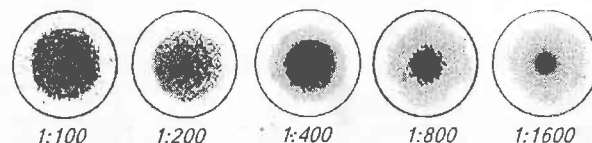


Рис. 58. Реакция гемагглютинации:

1:100...1:1600 — разведения сыворотки крови

ки взаимодействовать с детерминантами антигена, но реакция не завершается формированием макроскопически видимых комплексов антиген — антитело. В частности, РК используют для серодиагностики бруцеллеза животных. Предварительно сыворотки крови исследуют в обычной пробирочной РА. Исходя из результатов РА, для исследования берут пробирки с разведениями сыворотки, где нет агглютинации, но возможно произошло специфическое связывание «неполных» антител с бруцеллезными антигенами. Антиген из этих пробирок отмывают от несвязавшихся (свободных) белков сыворотки крови центрифугированием. К отмытому осадку корпускулярного бруцеллезного антигена добавляют 1 мл разведенной антиглобулиновой сыворотки, содержащей антитела к иммуноглобулинам сыворотки крови животных того вида, который исследуют на бруцеллез. Пробирки со смесью выдерживают при 37 °С 18 ч, затем при комнатной температуре 2...4 ч.

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

Оборудование для постановки серологических реакций. При массовых серологических исследованиях, определении титра сывороток используют оборудование, с помощью которого можно облегчить процедуру разведения сывороток, внесения компонентов реакции: автоматические пипетки, аппарат Флоринского, микротитратор «Такачи».

Аппарат Флоринского: благодаря групповой автоматической пипетке (рис. 59) одновременно разводят 10 сывороток крови или вносят компоненты в 10 стандартных серологических пробирок, размещенных в 100-гнездном штативе (10 × 10).

Микротитратор «Такачи» включает в себя полистироловые пластины (129 × 93 мм) с лунками, разбавители — устройства для взятия и разведения сывороток в объеме 0,025 и 0,05 мл, стеклянные пипетки-капельницы для разлива предусмотренных условиями опыта объемов растворителя. При помощи стеклянных пипеток, на которые надета капельная насадка в виде пластмассового конуса со стальной трубкой внутри, разливают

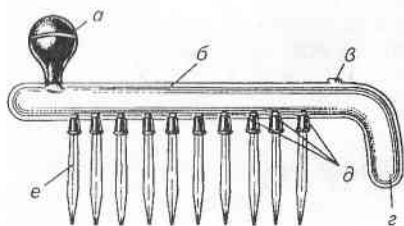


Рис. 59. Групповая автоматическая пипетка Флоринского:

a — резиновая груша; *b* — стеклянный цилиндр; *v* — отверстие для слива избыточной жидкости; *z* — приемник для избыточной жидкости; *d* — отверстия в нижней части цилиндра; *e* — пипетки-мерники

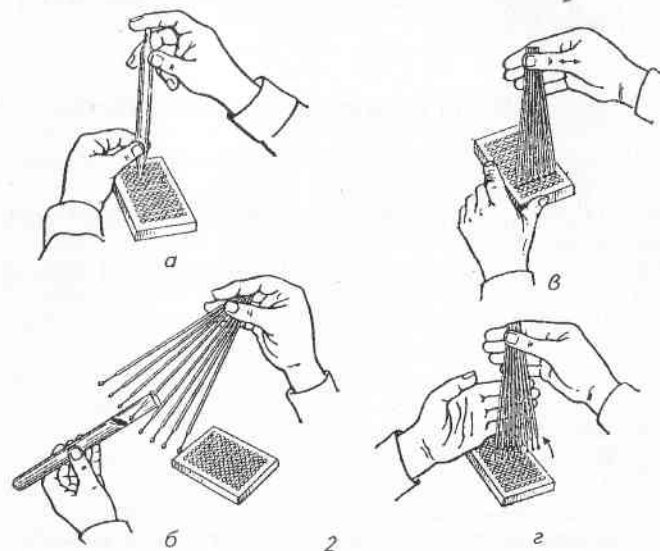
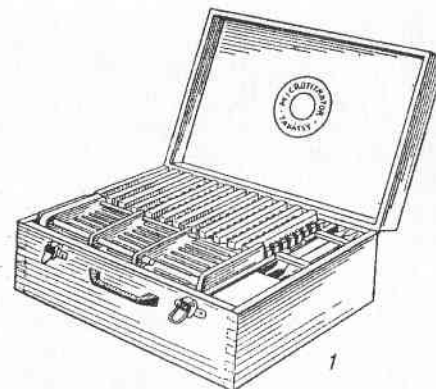


Рис. 60. Прибор Такачи — аппарат для серологического микротитрования. Приготовление серийных разведений:

1 — общий вид; 2 — схема работы с аппаратом Такачи (объяснение в тексте)

по лункам пластины физиологический раствор либо буферный раствор в объеме 0,025 мл (одна капля) или 0,05 мл (две капли). Капли определенного объема (0,025 мл) формируются при условии, что пипетку держат строго вертикально на расстоянии 1 см от пластины (рис. 60, *a*). Затем при помощи разбавителей берут необходимое количество сыворотки крови. Разбавитель представляет собой тонкие металлические стержни с наконечни-

ками полусферической формы, состоящими из пластин с вертикальными прорезями. Ось стержня выступает впереди наконечника, что предохраняет его от повреждений. Обычно одновременно используют несколько разбавителей и держат их веерообразно (рис. 60, б). Головки разбавителей с сывороткой помещают в лунки первого ряда, вращая ось, перемещивают сыворотку с раствором, затем переносят разведенную сыворотку в следующий ряд лунок, обеспечивая при этом ее разведение в два раза и т. д. (рис. 60, в). На завершающем этапе в лунки с помощью капельной пипетки вносят остальные компоненты реакции (рис. 60, г). Эти приспособления можно применять при постановке многих серологических реакций (РА, РСК, РНГА и т. д.).

Для внесения компонентов реакции в лунки планшетов все чаще используют 4-, 8- и 12-канальные автоматические пипетки с изменяющимися объемами (5...250 мкл) и пластиковые наконечники.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Идентифицировать культуры эшерихий и сальмонелл в РА на стекле с О-агглютинирующими сыворотками.
2. Определить титр положительной бруцеллезной сыворотки в пробирочной РА.
3. Учесть результаты титрования позитивной сыворотки в РНГА.

Контрольные вопросы

1. Какие типы антигенов используют в РА?
2. В чем сущность феномена агглютинации?
3. Что такое качественная и количественная РА?
4. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицирует в РА?
5. Как определить титр сыворотки крови в пробирочной РА?
6. Каким образом получают эритроцитарные диагностикумы для РНГА?
7. В чем сущность реакции Кумбса?

Тема 16

РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП): КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ (РКП), ДИФФУЗИОННОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РДП); ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Цель занятия. Ознакомить студентов с сущностью и техникой постановки реакций кольцепреципитации, диффузионной преципитации, методом иммуноэлектрофореза. Рассмотреть их практическое использование.

Оборудование и материалы. Сибиреязвенная преципитирующая сыворотка, стандартный сибиреязвенный антиген, стерильный физиологический раствор, пипетки Пастера, пробирки Уленгута, 1,5%-й агаровый гель с мертиоломом (конечное разведение 1:10 000), стерильные чашки Петри, камера для иммуноэлектрофореза, готовые иммунофореграммы, штампы для РДП.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Реакция преципитации (РП), как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпускулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген — антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) — преципитацией (от лат. *praecipitatio* — падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

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

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

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз — прогревание материала, например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т. д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

Выбор того или иного способа выделения растворимого антигена зависит от его химической природы. Главное требование к любому из методов — эффективное извлечение антигена без его денатурации.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии; принцип реакции

преципитации использован в иммуноэлектрофорезе и встречном иммуноэлектрофорезе.

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

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

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

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

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

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

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных — отрицательный результат (рис. 61).

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

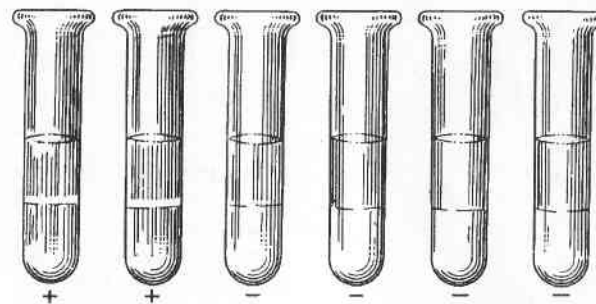


Рис. 61. Реакция кольцепреципитации в пробирках

пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантигенов, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2...7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта.

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

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

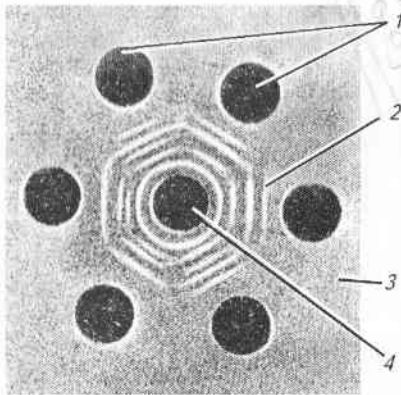


Рис. 62. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони:

1 — лунки со сравниваемыми антигенами (периферические); 2 — полосы преципитации; 3 — пластинка с агаровым гелем; 4 — лунка с иммунной сывороткой

антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10...72 ч (рис. 62).

Учет результатов: полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т. е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надсадочной жидкости после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител.)

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции (рис. 63, 64, 65).

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты — антигены оценивают как идентичные).

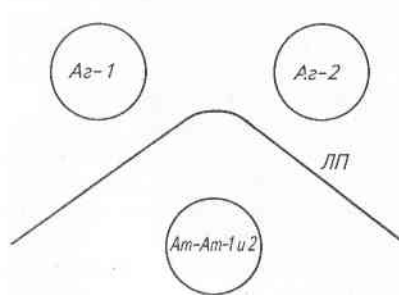


Рис. 63. РДП. 1-й вариант. Линии преципитации сливаются, сравниваемые антигены идентичны:

Ag-1, Ag-2 — сравниваемые антигены; Am — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации

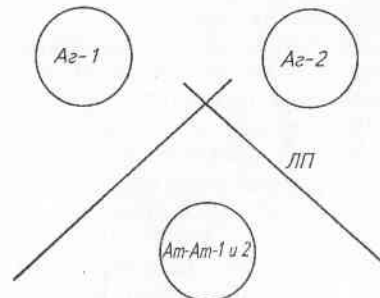
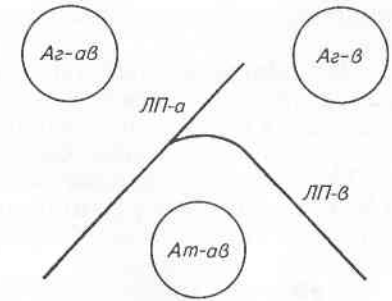


Рис. 64. РДП. 2-й вариант. Линии преципитации пересекаются — «реакция неидентичности», у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант:

Ag-1, Ag-2 — сравниваемые антигены; Am — антитела к сравниваемым антигенам; ЛП — линия преципитации

Рис. 65. РДП. 3-й вариант. Линии преципитации частично сливаются, у сравниваемых антигенов гомологичные (общие) и гетерологичные детерминанты:

Ag-ав, Ag-в — сравниваемые антигены; «в» — гомологичная (общая) антигенная детерминанта в сравниваемых антигенах; «а» — специфическая антигенная детерминанта антигена Ag-ав; Am-ав — антитела к антигенам Ag-ав, Ag-в; ЛП-в — линия преципитации гомологичных антигенов «в»; ЛП-а — линия преципитации антигена «а» — «шпора»



2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант).

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

С помощью реакции диффузионной преципитации можно обнаруживать антитела в сыворотке крови и определять их титр. В этом случае в центральную лунку вносят известный растворимый антиген (бактериальный, вирусный), а в периферические — различные разведения исследуемой сыворотки крови (рис. 66).

Чтобы полосы преципитации стали более выраженными, пластины обрабатывают солями кадмия: пластины с готовым гелем отмывают в физиологическом растворе и заливают 0,65%-м раствором сульфата кадмия. В результате через несколько минут полосы преципитации становятся более ярко выраженными (в несколько раз).

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ). Метод электрофоретического разделения антигенных смесей в агаровом геле с последующим выявлением отдельных антигенов при помощи реакции диффузионной преципитации. Иммуноэлектрофорез применяют для изучения состава сложных антигенных смесей, например

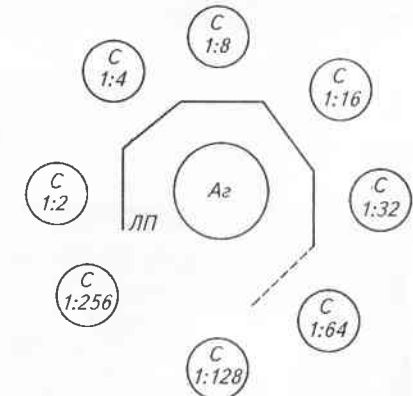


Рис. 66. РДП. Обнаружение антител в исследуемой сыворотке крови:

C 1:2...C 1:256 — разведения исследуемой сыворотки крови; Ag — известный микробный антиген; ЛП — линия преципитации. Титр сыворотки в данном случае составляет 1:64

микробных растворимых антигенов, белков сыворотки крови и т. д.

Для приготовления агарового геля и заполнения кювет электрофоретической камеры используют различные буферные растворы: 1) веронал-мединаловый (барбитуратный) буферный раствор, рН 8,6, ионная сила 0,05; веронал — 1,84 г, мединал — 10,3 г, дистиллированная вода — до 1000 мл; 2) трис-буфер, рН 8,9; трис (оксиметил)-аминометан — 60,5 г, этилендиаминотетрауксусная кислота — 6 г, борная кислота — 4,6 г, дистиллированная вода — до 1000 мл.

Существует много других буферных растворов, различающихся по значениям рН и ионной силе. Ионная сила (μ) равна половине суммы произведения концентрации каждого иона, присутствующего в растворе, на квадрат его валентности. Чем ниже ионная сила буфера, тем быстрее двигаются белки, но чрезмерное снижение ионной силы ухудшает разделение компонентов.

Для проведения электрофореза расплавленный гель наливают на стеклянные пластины размером (13...18) × (18...24) см (макрометод) или на предметные стекла (микрометод) слоем толщиной 2...4 мм. Затем в агаровом геле с помощью пробойников вырезают лунки для растворов, подлежащих электрофоретическому разделению. Если объем жидкости достаточно велик (макрометод), то ее предварительно диализируют против буферного раствора, который используют для электрофореза.

Подготовленную пластину помещают в камеру для электрофореза (рис. 67, 68). Слой агара на пластине благодаря агаровым «мостикам» или полоскам хроматографической бумаги сообщается с анодной и катодной кюветами, заполненными буферным ра-

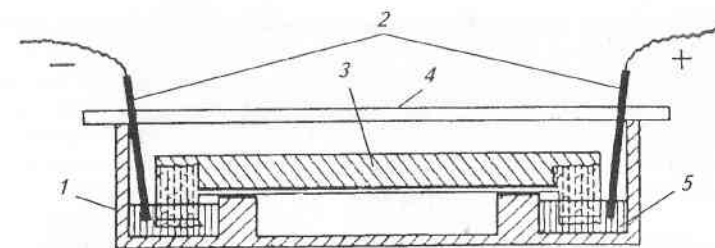


Рис. 68. Схема прибора для электрофореза:

1 — камера для электрофореза; 2 — электроды; 3 — пластина агарового геля; 4 — крышка камеры; 5 — буферный раствор

створом. Ток через выпрямитель поступает на пластину с агаром (напряжение обычно 300...500 В и силой тока 30...40 А). Если градиент потенциала на агаровой пластине составляет 5...6 В/см, то на пластине длиной 18 см разгонка белков завершается за четыре-пять часов, при меньших размерах пластины разгонка происходит быстрее.

По истечении указанного времени пластину с гелем вынимают из камеры, в агаре по длине пластины прорезают траншею, которую заполняют иммунной сывороткой. Пластины помещают во влажную камеру. Образование дуг преципитации завершается через несколько суток (рис. 69). Электрофореграммы можно высушивать на стеклах, окрашивать или при помощи специальных реактивов определять химическую природу веществ в дугах преципитации.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Освоить технику постановки и учета результатов кольцевой РП и РДП.
2. Изучить метод иммуноэлектрофореза, иммунофореграммы.

Рис. 69. Иммунофореграмма цельной сыворотки и определение компонентов сыворотки, содержащих преципитирующие антигены:

1 — γ -глобулин; 2 — β -глобулин; 3 — α -глобулин; 4 — альбумин; 5 — канавка, заполненная антисывороткой к цельной бычьей сыворотке; 6 — канавка с раствором овальбумина; 7 — сыворотка телят, иммунизированных овальбумином; 8 — линия преципитации, которая указывает, что антигены к овальбумину расположены во фракции IgG

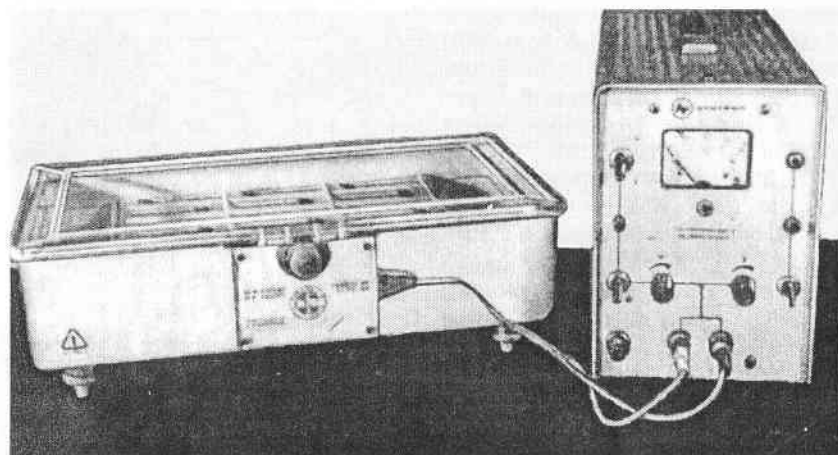
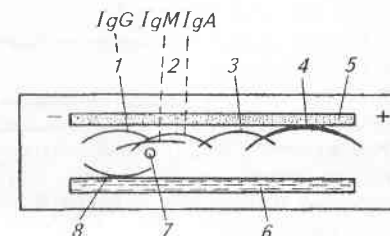


Рис. 67. Электрофоретическая камера с источником электропитания

Контрольные вопросы

1. В чем сущность феномена преципитации?
2. Какова техника постановки кольцевой РП и РДП?
3. Для каких целей применяют метод иммуноэлектрофореза?

Тема 17

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

Цель занятия. Ознакомить студентов с принципом и техникой постановки реакции связывания комплемента.

Оборудование и материалы. Физиологический раствор, 2,5%-я суспензия эритроцитов барана в физиологическом растворе, бруцеллезный антиген, положительная бруцеллезная сыворотка, нормальная сыворотка крупного рогатого скота, комплемент морской свинки, гемолизин, мерные пипетки на 1,5 мл, водяная баня.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Помимо серологических реакций осадочного типа (РА, РП) в диагностике инфекционных болезней широко используют реакцию связывания комплемента (РСК), в которой факт взаимодействия антигена и антитела устанавливают при помощи специальной индикаторной системы, которую лизирует комплемент. Механизм иммунного лизиса с участием комплемента рассмотрен в теме 15.

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

Комплемент (С) не способен соединиться с антигеном (АГ) или с антителами (АТ) в отдельности, но реагирует с образовавшимся комплексом АГ·АТ. В РСК участвуют две системы: АГ·АТ и комплемент.

Исследуемая АГ·АТ-система: искомым компонент (например, антитела) в ней может количественно варьировать или полностью отсутствовать. При взаимодействии комплемента с системой АГ·АТ видимые феномены отсутствуют.

Индикаторная АГ·АТ-система состоит из эритроцитов барана (антиген) и гемолизина (антитела к эритроцитам барана). При взаимодействии комплемента с системой АГ·АТ наблюдают процесс иммунного лизиса эритроцитов. На конкуренции исследуемой и индикаторной систем АГ·АТ за комплемент основана диагностическая РСК. Рассмотрим ее принцип на модели обнаружения антител в исследуемой сыворотке при помощи известного антигена.

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

Антитела в исследуемой сыворотке отсутствуют

Комплекс АГ·АТ·С не образовался, С остался в активном состоянии и способен реагировать с другим комплексом АГ·АТ, т. е. лизировать индикаторную систему

Антитела в исследуемой сыворотке присутствуют

Образовался комплекс АГ·АТ·С, комплемент инактивирован, при внесении в пробирку индикаторной системы ее лизис не происходит

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

Солевой раствор для разведения компонентов: используют физиологический раствор. Более стабильные результаты иммунного гемолиза получают при введении в раствор ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , поскольку они необходимы для эффективного действия системы комплемента.

Эритроциты барана: эритроциты дефибринированной крови барана отмывают физиологическим раствором (2500 мин⁻¹ три раза по 5 мин). В реакции обычно используют 2,5%-ю суспензию. При необходимости длительного использования ее хранят в растворе Ольсвера: хлорид натрия — 4,2 г, лимонная кислота — 0,55 г, цитрат натрия — 8 г, декстроза — 20,5 г, дистиллированная вода — 10 мл (рН 6,1). Раствор стерилизуют автоклавированием и смешивают с кровью в соотношении 1:2. Эритроциты, хранящиеся в растворе Ольсвера при 4...6 °С, можно использовать в течение 30...40 сут.

Гемолизин выпускают биофабрики. Представляет собой сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана, содержащую антитела к эритроцитам. На коробках с гемолизином указывают его активность в виде титра, определенно-го в реакции иммунного лизиса.

Комплемент — сыворотка крови морской свинки. Биофабрики выпускают комплемент в лиофилизированном виде (срок годности 1 год). В случае необходимости комплемент можно получить пункцией сердца морской свинки при помощи шприца с иглой.

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

Титрование гемоллизина. При достаточно длительном хранении необходимо определять активность гемоллизина путем его титрования в реакции иммунного гемолиза. Результаты этого опыта показывают, в какой оптимальной концентрации необходимо вводить в РСК гемоллизин, чтобы обеспечить работу индикаторной системы. Титром гемоллизина называют его максимальное разведение, при котором в присутствии оптимального количества комплемента гемоллизин способен обеспечить полный лизис суспензии эритроцитов.

При титровании готовят вспомогательные разведения гемоллизина (табл. 9). Их переносят в 8 пустых пробирок и добавляют другие компоненты (табл. 10).

9. Подготовка вспомогательного ряда разведений гемоллизина

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

10. Схема титрования гемоллизина

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | | | | | | |
|---|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|--------------------------------|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й | 7-й | 8-й | 9-й (контроль эритроцитов) | 10-й (контроль комплемента) |
| Гемоллизин в возрастающих разведениях | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — |
| Комплемент, разведенный в соотношении 1 : 20 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | 0,2 |
| Эритроциты, 2,5%-я суспензия | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Физиологический раствор (вместо антигена и исследуемой сыворотки) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,6 |
| Учет результатов | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ЧГ | ЧГ | ЧГ | НГ | НГ | НГ |

Примечание. ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз; НГ — нет гемолиза.

В приведенном примере титр гемоллизина составляет 1 : 2000 (4-я пробирка). Для постановки РСК обычно берут удвоенное количество гемоллизина — в данном случае 1 : 1000 (рабочий титр).

Титрование комплемента. Комплемент титруют каждый раз в день постановки главного опыта РСК. За титр комплемента принимают его минимальное количество, которое вызывает полный лизис определенной дозы суспензии эритроцитов в присутствии рабочей дозы гемоллизина. Комплемент титруют в гемолитической или бактериолитической системе. Титрование комплемента в гемолитической системе, например, может быть проведено по указанной схеме (табл. 11).

11. Схема титрования комплемента в гемолитической системе

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

Инкубирование в водяной бане при 37 °С 10 мин

Примечание. Обозначения см. в табл. 10.

В нашем примере титр комплемента составил 0,1 мл. Активность комплемента могут снижать антиген и исследуемая сыворотка (антикомплемментарное действие). Чтобы нивелировать антикомплемментарность компонентов, комплемент берут в опыт на 20...40 % больше установленного титра. Для более точного определения титра рекомендуют титровать комплемент в присутствии сыворотки крови и антигена (титрование в бактериолитической системе).

Например, при серодиагностике бруцеллеза комплемент титруют на негативной и позитивной сыворотках, полученных от животных того же вида, что и исследуемая сыворотка. Каждую сыворотку разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают в водяной бане для инактивации собственного комплемента: сыворотки крупного рогатого скота — при 60...62 °С, лошадей — при 56...58 °С, буйволов — при 62...64 °С, ослов и мулов — при 64...65 °С, овец и коз — при 58...60 °С 30 мин, свиней — при 60...62 °С 50 мин.

Схема титрования комплемента в бактериолитической системе показана в таблице 12.

12. Схема титрования комплемента в бактериолитической системе

| Компонент реакции | Ряд пробирок в штативе | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | | | | | | | |
|---|------------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й | 7-й | 8-й | 9-й | 10-й | |
| Негативная сыворотка в разведении 1 : 5 | Первый | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | Второй | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Комплемент в разведении 1 : 20 | Первый | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,10 | 0,12 | 0,14 | 0,16 | 0,18 | 0,2 | 0,2 |
| | Второй | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,10 | 0,12 | 0,14 | 0,16 | 0,18 | 0,2 | 0,2 |
| Физиологический раствор | Первый | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,06 | 0,04 | 0,02 | — | — |
| | Второй | 0,18 | 0,16 | 0,14 | 0,12 | 0,10 | 0,08 | 0,06 | 0,04 | 0,02 | — | — |
| Антиген в рабочем титре | Первый | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | Второй | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Физиологический раствор | Первый | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | Второй | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Гемолитическая система (эритроциты барана + гемоллизин) | Первый | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| | Второй | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Учет результатов | Первый | НГ | НГ | ЧГ | ЧГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ |
| | Второй | НГ | НГ | ЧГ | ЧГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ | ПГ |

Примечание. Обозначения см. в табл. 10.

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

Главный опыт РСК. Кроме исследуемых сывороток крови при постановке основного опыта РСК в качестве контрольных используют положительную и отрицательную сыворотки крови. Все сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают при 56...64 °С в водяной бане для инактивации собственного комплемента. Схема главного опыта показана в таблице 13.

13. Главный опыт РСК

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | | | |
|---|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й | 7-й |
| Исследуемая сыворотка крови, разведенная 1 : 5 (1 : 10) | 0,2 | — | — | 0,2 | — | — | — |
| Положительная сыворотка | — | 0,2 | — | — | — | — | — |
| Отрицательная сыворотка | — | — | 0,2 | — | — | — | — |
| Антиген в рабочем титре | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | 0,2 | — | — |
| Физиологический раствор | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Комплемент в рабочем титре | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — |
| Инкубирование при 37 °С 20 мин или при 0...2 °С 18...20 ч* | | | | | | | |
| Эритроциты, 2,5%-я суспензия | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Гемоллизин в рабочем титре | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Инкубирование при 37 °С 20...30 мин | | | | | | | |

*Если первый этап РСК проводят при 0...4 °С 18...20 ч, то реакцию называют РДСК — реакция длительного связывания комплемента. РДСК более чувствительна, чем РСК.

Результат РСК учитывают по наличию или отсутствию гемолиза эритроцитов в пробирках и выражают в крестах: 1) (++++) — полная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость прозрачная); 2) (+++) — задержка гемолиза сильно выражена (после оседания эритроцитов жидкость слабо-розового цвета); 3) (++) — частичная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость интенсивно окрашена в красный цвет); 4) (+) — слабая задержка гемолиза (незначительный осадок эритроцитов, жидкость интенсивно окрашена); 5) (—) — полный гемолиз, осадка эритроцитов нет.

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

Учет результатов начинают с контрольных пробирок:
7-я пробирка — контроль физиологического раствора: гемолиза не должно быть;

6-я пробирка — контроль индикаторной системы и комплемента: должен быть полный гемолиз;

5-я пробирка — контроль антигена: должен быть полный гемолиз;

3-я пробирка — контроль с отрицательной сывороткой: должен быть полный гемолиз;

2-я пробирка — контроль с положительной сывороткой: должна быть задержка гемолиза.

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

Первоначально учитывают результаты в 4-й пробирке (безантигенный ряд) — контроль антикомплемментарности сыворотки. При полном гемолизе в 4-й пробирке (отсутствие антикомплемментарности) можно учитывать результат в 1-й пробирке (антигенный ряд), где результат может варьировать от полного гемолиза (отрицательный результат) до полной задержки гемолиза (положительный результат). Если исследуемая сыворотка антикомплемментарна, то результат в первой пробирке учитывать нельзя и от этого животного необходимо брать кровь для повторного исследования. Окончательный учет результатов РСК проводят через 18...20 ч, за это время нелизированные эритроциты оседают на дно пробирки.

В приведенном примере рассмотрен вариант постановки РСК в объеме 1 мл, когда каждый компонент взят в объеме 0,2 мл. Возможна постановка РСК в макрварианте (2,5 мл) или в капельном варианте.

Расчет количества компонентов для постановки РСК. Например, необходимо исследовать 100 сывороток крови. Сыворотку крови исследуют в разведениях 1 : 5, кроме того, с тем же разведением ставят контроль на антикомплемментарные свойства сыворотки (безантигенный ряд). Следовательно, на каждую сыворотку необходимо 2 пробирки, на 100 сывороток — 200 пробирок. РСК ставим в объеме 1 мл, и каждый компонент необходимо приготовить в объеме 40 мл ($0,2 \cdot 200$): гемолизин в рабочем титре, антиген в рабочем титре, 2,5%-я суспензия эритроцитов барана.

Титр комплемента в нашем опыте составил 0,12 мл в разведении 1 : 20. Следовательно, на 200 пробирок необходимо 24 мл комплемента, разведенного 1:20 ($0,12 \cdot 200 = 24$), а неразведенного — 1,2 мл ($24 : 20 = 1,2$). Ампула (флакон) обычно содержат 2 мл комплемента, и для проведения этого опыта достаточно вскрыть одну ампулу, взять из нее 1,2 мл комплемента и добавить к 38,8 мл физиологического раствора.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести титрование гемолизина и комплемента и определить их рабочие титры.
2. Поставить главный опыт РСК и учесть результаты.

Контрольные вопросы

1. Что представляет собой комплемент морской свинки? Как его консервируют?
2. На чем основано получение гемолизина?
3. В чем сущность иммунного гемолиза?
4. Что такое титр и рабочий титр гемолизина и комплемента?
5. Какова схема главного опыта РСК?
6. Для чего используют РСК?

Тема 18

МЕТОД ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (МФА). ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Цель занятия. Ознакомить студентов с принципом метода флуоресцирующих антител и техникой постановки реакции иммунофлуоресценции, с принципом и техникой проведения иммуноферментного анализа.

Оборудование и материалы. Инактивированные культуры бруцелл и сальмонелл, 96%-й этанол, ФСБР (рН 7,2...7,4), «влажная камера» (чашки Петри, эксикатор), люминесцирующие сыворотки против бруцелл, сальмонелл, иммуноглобулинов кролика, позитивная бруцеллезная сыворотка, готовый препарат для демонстрации результатов ИФА, люминесцентный микроскоп.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

В названных серологических реакциях используют антитела (иммунные сыворотки), меченные флуорохромом или ферментами, и в дальнейшем, применяя специальные методы, регистрируют образование комплекса антиген — антитело. В некоторых вариантах ИФА ферментную метку вводят в антиген.

Метод флуоресцирующих антител (МФА). Этот комплексный метод сочетает в себе серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса, и микроскопическое исследование, с помощью которого этот комплекс обнаруживают.

В реакции иммунофлуоресценции используют антитела, к которым присоединен флуорохром (чаще флуоресцеин — изотиоцианат). Такие антитела сохраняют способность специфически

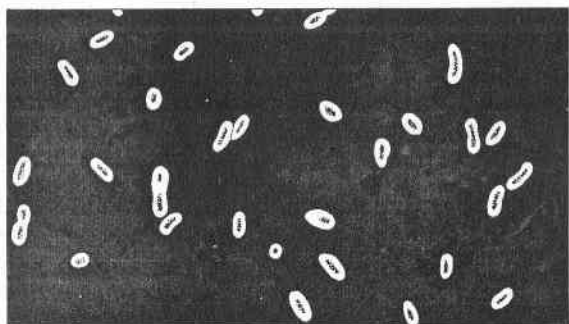


Рис. 70. Люминесцентная микроскопия бактерий. Прямой метод иммунофлуоресценции. На темном фоне поля зрения видны светящиеся (флуоресцирующие) бактериальные клетки

реагировать с антигеном и благодаря флуорохрому светиться под воздействием ультрафиолетовых лучей. При постановке МФА микробный антиген фиксируют на предметном стекле и обрабатывают люминесцирующими антителами. Затем препарат отмывают водой от несвязавшихся антител и просматривают в люминесцентном микроскопе. Если антитела специфически соответствуют данному антигену, то они образуют с антигеном прочный комплекс и при люминесцентной микроскопии в препарате обнаруживают светящиеся микробные клетки (рис. 70).

Преимущество МФА как диагностического метода состоит в том, что с его помощью возможно за два-три часа серологически идентифицировать микроорганизм непосредственно в патологическом материале, без выделения в чистой культуре (экспресс-метод). Как и другие серологические реакции, МФА применяют и для выявления антител в крови животных.

Приготовление препарата для МФА. При выявлении возбудителя инфекции (антигена) на предметном стекле готовят мазки-отпечатки из органов или другого материала. Чтобы обнаружить антитела в исследуемой сыворотке крови, на предметном стекле готовят мазки из известного антигена, например возбудителя сальмонеллеза, сибирской язвы и др. Препарат с нанесенным материалом (бактериальная суспензия, мазок-отпечаток) подсушивают на воздухе и фиксируют ацетоном (5 мин), или этанолом (10...15 мин), или метанолом (5...10 мин). Препарат можно фиксировать и нагреванием, как при обычной световой микроскопии. Мазки-отпечатки из органов и тканей лучше обрабатывать охлажденным до -20°C ацетоном 2...4 мин. В зависимости от конкретных задач окрашивание готовых препаратов люминесцирующими сыворотками проводят различными способами.

Прямой МФА. Разработал Coons с соавт. (1950). На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей иммунной сыворотки в рабочем разведении, содержащей антитела против искомого антигена. Чтобы избежать высыхания, препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри) с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при $37...38^{\circ}\text{C}$ 15...30 мин. Затем препарат 5...10 мин промывают от несвязавшихся иммуноглобулинов проточной (водопроводной) водой с рН не ниже 7,0. Промытый препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Прямой МФА используют только для идентификации неизвестного антигена; к его недостатку относят необходимость приготовления люминесцирующей сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Непрямой МФА. Применяют в двух вариантах.

Двухступенчатый МФА предложили Weller и Coons (1954). Этот вариант считают более универсальным, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов.

На антиген наносят каплю немеченой иммунной сыворотки (сыворотка первой ступени). Препарат выдерживают в термостате 15...30 мин, затем его промывают, чтобы удалить несвязавшиеся антитела иммунной сыворотки, и просушивают (см. прямой вариант). Если антитела сыворотки первой ступени соответствуют антигену, то вода не вымывает образовавшийся АГ—АТ-комплекс (антитела зафиксированы на антигене).

На подсушенный препарат наносят каплю люминесцирующей антивидовой сыворотки (сыворотка второй ступени) в рабочем титре. Препарат повторно помещают в термостат во влажной камере на 15...30 мин, затем промывают водой и подсушивают. Антивидовая сыворотка представляет собой меченые флуорохромом антитела против иммуноглобулинов крови животного того вида, от которого получена иммунная сыворотка первой ступени. Таким образом, антитела первой сыворотки служат антигеном для меченых антител антивидовой сыворотки. В результате к образовавшемуся на первом этапе АГ—АТ-комплексу присоединяются антитела второй ступени, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе.

Универсальность непрямого варианта обусловлена тем, что, используя на первом этапе полученные от животных одного вида (например, от лошадей) иммунные сыворотки против различных микроорганизмов, на втором этапе с помощью одной антивидовой сыворотки можно идентифицировать неограниченное количество возбудителей инфекционных болезней.

Трехступенчатый МФА представляет собой вариант РСК на стекле. В данном случае в иммунном комплексе на

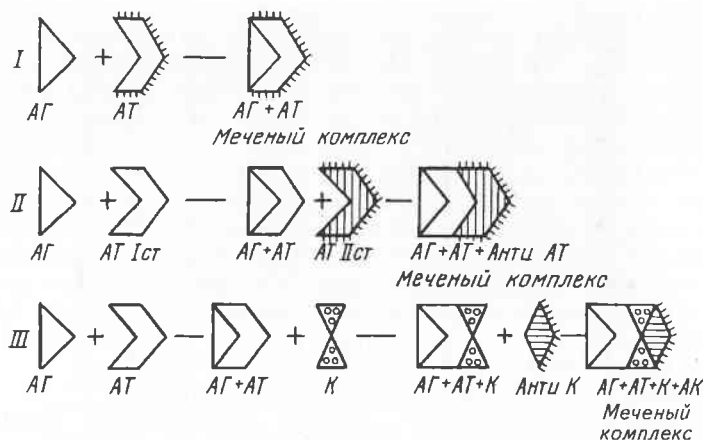


Рис. 71. Схема вариантов метода флуоресцирующих антител.

Условные обозначения: I — первая ступень; II — вторая ступень; III — третья ступень; AG — антиген; AT — антитела; AT I ст — иммунная сыворотка; AT II ст — люминесцирующая антивидовая сыворотка; K — комплемент; λ — меченое антитело

стекле при помощи люминесцирующей сыворотки выявляют связанный комплемент (рис. 71).

Двухступенчатый или трехступенчатый МФА при использовании известного антигена можно обнаруживать антитела в крови животных.

Для подтверждения специфичности результатов МФА необходимы контроли. Для прямого варианта достаточно одного контроля: гомологичные и гетерологичные в антигенном отношении микроорганизмы обрабатывают люминесцирующей сывороткой. В первом случае наблюдают свечение бактерий, во втором свечение отсутствует.

Для непрямого варианта ставят два контроля: 1) мазки, содержащие гомологичные и гетерологичные в антигенном отношении микроорганизмы, обрабатывают антивидовой люминесцирующей сывороткой. При отсутствии антител первой ступени клетки не должны люминесцировать; 2) мазки с гомологичными и гетерологичными в антигенном отношении бактериями обрабатывают иммунной (антимикробной) сывороткой (первый этап) с последующим нанесением флуоресцирующей антиглобулиновой (антивидовой) сыворотки (второй этап). Специфическое свечение бактерий наблюдают в первом случае, во втором оно отсутствует.

Оценка результатов МФА. Учитывают яркость свечения, цвет, локализацию и структуру свечения. У бактерий, окрашенных (обработанных) люминесцирующей сывороткой, меченой изоцианатом флуоресцеина, обычно наблюдают яркое зеленое све-

чение по периферии клетки в виде ободка или ореола, центральная часть бактерий светится слабо. Такой характер свечения объясняют тем, что с единицы площади по периферии микробной клетки на сетчатку глаза наблюдателя проецируется в несколько раз больше антител, чем с центральной ее части. Следует учитывать, что у пластичных бактерий (лептоспиры, вибрионы) светится вся клетка. У клеток, погруженных в тканевую жидкость, и у молодых бацилл сибирской язвы контур обычно выражен нерезко.

Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: 1) (++++) — очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темной центральной частью клетки; 2) (+++) — яркая флуоресценция периферии клетки; 3) (++) — слабое свечение периферии клетки; 4) (+) — нет контрастного свечения периферии и центральной части микробной клетки. Отсутствие специфического свечения обозначают знаком «минус» (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей болезней положительным результатом чаще считают специфическое свечение бактериальных клеток не ниже, чем на четыре или три креста.

Иммуоферментный анализ (ИФА). Этот метод получил распространение после того, как была решена задача введения ферментной метки в молекулы антител или антигенов. Антитела, связанные с ферментом, сохраняют способность специфически реагировать с гомологичным антигеном, а фермент — взаимодействовать с соответствующим субстратом.

ИФА обычно используют в гистохимическом (иммунопериоксидазная реакция) и твердофазном вариантах.

Гистохимический ИФА. При помощи этого метода обычно обнаруживают микробные антигены в мазках-отпечатках, мазках крови, гистосрезках. Как и в случае МФА, пероксидазную реакцию используют в прямом и непрямом вариантах.

Прямая иммунопериоксидазная реакция. В качестве известного компонента используют меченные пероксидазой антитела против какого-либо патогенного микроорганизма. Препарат, например мазки-отпечатки, фиксируют охлажденным ацетоном ($-15...-20^{\circ}\text{C}$), подсушивают, наносят четыре-пять капель конъюгата в рабочем титре (меченые антитела), инкубируют во влажной камере при 37°C 1...2 ч, промывают физиологическим раствором 15 мин, ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают, наносят на препарат несколько капель раствора субстрата (25 мг 3,3-ДАБ · 4HCl растворяют в 100 мл 0,05 М трис-буфера с pH 7,5 и 25 мл этого раствора объединяют с 3 мл 0,5%-го раствора перекиси водорода). Препарат с субстратом выдерживают 5...10 мин, промывают в физиологическом растворе 10 мин, ополаскивают дистиллированной водой и микроскопируют.

Если в исследуемом материале присутствует искомый микробный антиген, то меченные пероксидазой антитела с ним специфически связываются. Внесение субстрата к пероксидазе приводит к образованию цветного продукта, видимого при микроскопии сначала как гранулы голубого, а позднее желто-коричневого цвета.

Непрямая иммунопероксидазная реакция. Как и в МФА, используют меченные пероксидазой антитела к иммуноглобулинам определенного вида животных. На первом этапе фиксированный охлажденным ацетоном препарат с исследуемым материалом обрабатывают во влажной камере при 37...38 °С 1...2 ч иммунной сывороткой (0,2...0,3 мл), содержащей немеченые антитела к искомому антигену. Затем препарат промывают физиологическим раствором 5 мин, подсушивают и обрабатывают при 37...38 °С 1...6 ч во влажной камере антителами, меченными пероксидазой (конъюгат в рабочем разведении). Последующие операции и учет результатов аналогичны прямому варианту пероксидазной реакции.

Твердофазный ИФА. Применяют наиболее широко. В этом случае антитела или антигены фиксируют на нерастворимых носителях: микропанелях, стеклянных или нейлоновых шариках.

При различных вариантах реакции результаты учитывают инструментально или визуально.

Обнаружение антигена по схеме «сэндвич» состоит из следующих этапов.

Лунки полистироловых микропанелей сенсibiliзируют специфическими для искомого антигена антителами* в концентрации 10...30 мкг/мл. Обычно в лунку вносят по 0,2 мл раствора антител в буфере с рН 9,6, выдерживают при 37 °С 1 ч и затем оставляют на ночь при 4 °С. Удаляют раствор иммуноглобулинов, панели промывают ФСБР (рН 7,4) три раза, чтобы удалить избыток свободных (несорбированных) антител.

В лунки вносят по 0,2 мл раствора, содержащего исследуемый антиген, и инкубируют при 37 °С 2 ч, затем панели вновь промывают, как ранее описано.

В лунки вносят по 0,2 мл меченных ферментом специфических антител (конъюгат)**; панели инкубируют при 37 °С 1...2 ч, затем их отмывают от несвязавшихся антител.

В лунки вносят 0,2 мл раствора ферментного субстрата [орто-фенилендиамин (ОФД) или 5-аминосалициловая кислота — для пероксидазы и р-нитрофенилфосфат — для щелочной фосфатазы] и инкубируют в темноте при 20...22 °С 5...30 мин.

Реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2 н. раствора

* Немеченые.

** Меченые антитела к разным эпитопам одного антигена.

серной кислоты (для пероксидазы) и 3 М раствора гидроксида натрия (для щелочной фосфатазы).

Учет результатов визуальный или спектрофотометрический по увеличению поглощения при длине волн 490 нм (пероксидаза) или 405 нм (щелочная фосфатаза). Субстрат ОФД: положительный результат — оранжево-коричневое окрашивание. Субстрат 5-аминосалициловая кислота: положительный результат — интенсивное коричневое окрашивание.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в пять-шесть раз.

Обнаружение антител (в сыворотке крови) основано на том же принципе, но твердофазный носитель сенсibiliзируют известным антигеном, обрабатывают исследуемой сывороткой, затем антивидовым иммуноглобулином, меченным ферментом. Вносят субстрат и по цветной реакции судят о наличии или отсутствии антител в исследуемой сыворотке крови.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Идентифицировать культуры возбудителей бруцеллеза и сальмонеллеза прямым МФА.
2. Идентифицировать двухступенчатым МФА культуру сальмонелл.
3. Изучить микроскопическую картину при учете результатов гистохимического ИФА (иммунопероксидазный тест).

Контрольные вопросы

1. В чем сущность одноступенчатого, двухступенчатого и трехступенчатого МФА?
2. Для каких целей используют МФА?
3. Какие разработаны варианты ИФА?

Тема 19

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН)

Цель занятия. Ознакомить студентов с реакцией нейтрализации (РН). Освоить технику постановки РН для обнаружения и идентификации бактериальных токсинов.

Оборудование и материалы. Бульонные токсинсодержащие культуры *S. perfringens*, центрифуга, центрифужные пробирки, стерильные бактериологические пробирки, стерильный физиологический раствор, воронки, ватно-марлевые фильтры, стерилизатор со шприцами и инъекционными иглами, диагностические антитоксические сыворотки *S. perfringens*, белые мыши массой 16...18 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Реакцию нейтрализации относят к иммунологическим реакциям, в которых, например, учитывают потерю биологической активности антигена при взаимодействии с гомологичными антителами. Если антигеном служит бактериальный экзотоксин, то он теряет свои токсические свойства (нейтрализуется), вирус как антиген теряет в этом случае инфекционное действие и т. д.

В бактериологических диагностических исследованиях наиболее часто используют РН как метод обнаружения и идентификации бактериальных токсинов.

РН бактериального экзотоксина. Используют при диагностике таких бактериозов, как ботулизм, инфекционная энтеротоксемия овец и др., возбудители которых (*C. botulinum*, *C. perfringens*) синтезируют сильный экзотоксин. Для постановки диагноза на эти бактериальные инфекции достаточно обнаружить экзотоксин в РН. Рассмотрим технику постановки РН на примере обнаружения токсинов *C. perfringens*. Для постановки РН необходимы диагностические иммунные сыворотки, содержащие антитела к определенному бактериальному токсину, — антитоксические сыворотки. Такие диагностические сыворотки получают путем гипериммунизации животных-продуцентов анатоксинами, токсинами инактивированными (формальдегидом), но сохранившими свои иммуногенные свойства. *C. perfringens* продуцирует шесть типов экзотоксинов, различающихся по антигенной структуре (А, В, С, D, E, F).

Исследуемый материал, в котором предположительно находится токсин (содержимое кишечника), разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 1, экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют при 5000 мин^{-1} 20 мин. Надосадочную жидкость вводят внутривенно или внутривенно по 0,5 мл двум белым мышам массой 16...18 г. При наличии токсина в исследуемом материале животные погибают в течение 12 ч. После обнаружения токсина его идентифицируют в реакции нейтрализации.

Схема постановки РН на примере определения типа токсина *C. perfringens* показана в таблице 14. Диагностические антитоксические сыворотки (типов А, С, D, E) предварительно разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 10 ед/мл.

14. Схема постановки РН на примере определения типа токсина *C. perfringens*

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | | |
|---|---------------------------------------|------|------|------|----------------|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й (контроль) |
| Фильтрат исследуемого материала | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Диагностические антитоксические сыворотки | 1(A) | 1(C) | 1(D) | 1(E) | — |
| Физиологический раствор | — | — | — | — | 1 |

Инкубируют при 37 °С 30 мин

Содержимое каждой пробирки после инкубирования вводят внутривенно или внутривенно по 0,5 мл двум белым мышам. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч. Если токсин принадлежит *C. perfringens*, то мыши, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, остаются живы (табл. 15).

15. Учет результатов РН на примере определения типа токсина *C. perfringens*

| Тип токсина | Антитоксическая сыворотка | | | | Контроль |
|-------------|---------------------------|---|---|---|----------|
| | А | С | D | E | |
| A | — | × | × | × | + |
| B, C, F | + | — | + | + | + |
| D | + | + | — | + | + |
| E | + | + | + | — | + |

Примечание. (+) — мыши пали; (—) — мыши живы; (×) — результат не учитывают.

Другие варианты РН. При помощи нейтрализации антителами гемолизинов, продуцируемых различными штаммами бактерий одного вида, можно подтвердить антигенную однородность гемолизина или доказать, что данный вид бактерий синтезирует несколько антигенных вариантов гемолизина.

В вирусологических исследованиях широко используют реакцию нейтрализации инфекционного действия вируса при помощи гомологичной иммунной сыворотки. Факт нейтрализации вируса антителами устанавливают, заражая различные чувствительные биологические объекты: лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток. Технические детали РН в вирусологической практике подробно изложены в соответствующем курсе.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

Освоить технику постановки реакции нейтрализации по выявлению и идентификации токсинов *C. perfringens*.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность реакции нейтрализации?
2. Какие применяют варианты реакции нейтрализации?
3. Каким образом устанавливают тип бактериального токсина в РН?

СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ, ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Цель занятия. Ознакомить студентов с вакцинами различных типов, лечебно-профилактическими и диагностическими иммунными сыворотками, антигенами, аллергенами и принципами их контроля.

Оборудование и материалы. Вакцины против рожи свиней из штамма ВР-2, против сальмонеллеза из штамма ТС-177, против лептоспироза, ботулизма, пастереллеза, лечебно-профилактические иммунные сыворотки против пастереллеза, рожи свиней, диагностические агглютинирующие и флуоресцирующие сальмонеллезные сыворотки, диагностические аллергены — бруцеллин, туберкулин, маллеин, стерильные МПА, МПБ, среда Китта—Тароцци в пробирках, агар Сабуро, стерильные пипетки Пастера, физиологический раствор, нефлуоресцирующее иммерсионное масло, люминесцентный микроскоп, сенсibilизированные бруцеллами морские свинки с положительной реакцией ГЗТ.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Вакцины. Эти биологические препараты содержат в качестве активного начала цельные микробные клетки или их компоненты. Вакцины предназначены для создания искусственного активного иммунитета. Различают несколько основных типов вакцин против инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

Вакцины инактивированные корпускулярные содержат в качестве иммуногенного начала цельные инактивированные микробные клетки. При конструировании вакцин в их состав включают штаммы одного или нескольких сероваров в зависимости от антигенной гетерогенности конкретного возбудителя. Используют штаммы бактерий без признаков диссоциации. Бактериальную массу чаще получают, культивируя вакцинные штаммы в жидких питательных средах в ферментерах. На следующем этапе бактериальные клетки инактивируют физическими (прогревание при 55...60 °С, ультразвук, ультрафиолетовое облучение, ионизирующее излучение) или химическими методами (применяют такие средства, как формалин, глutarовый альдегид, бета-пропиолактон, кристаллвиолет, метиленовый синий и т.д.). К любому методу инактивации микроорганизмов предъявляют два основных требования: 1) 100%-я инактивация клеток возбудителя; 2) отсутствие существенных нарушений в антигенных и иммуногенных свойствах клетки возбудителя.

После инактивации устанавливают необходимую концентрацию микробных клеток в 1 мл суспензии (концентрированием или, наоборот, разбавлением), корректируют рН, добавляют тот или иной адьювант, препарат расфасовывают и контролируют.

Анатоксинвакцины содержат в качестве иммуногенного начала инактивированный формалином токсин бактерий. При ряде токсикоинфекций иммунитет в основном анти-токсический (ботулизм), обусловленный выработкой антител против бактериального экзотоксина. Для получения анатоксинвакцин токсинобразующий штамм возбудителя культивируют в жидкой питательной среде в условиях, обеспечивающих максимальное накопление токсина в культуральной жидкости. Затем экзотоксин освобождают от бактерий, добавляют к нему формалин и выдерживают смесь в тепле. Под воздействием формалина токсин переходит в нетоксическую форму (анатоксин), которая сохраняет иммуногенные свойства. В качестве адьюванта в вакцинах подобного типа обычно используют гидроксид алюминия.

Анавакцины: при производстве некоторых вакцин микробную массу и токсин не разделяют, и готовый препарат содержит инактивированные микробные клетки и анатоксин.

Химические вакцины в качестве иммуногенного начала содержат извлеченные тем или иным способом из микробной клетки различные химические соединения. Полученные вещества должны сохранить иммуногенные свойства, т.е. быть протективными антигенами. К преимуществу химических вакцин относят возможность отделить иммуногенный компонент от балластных веществ клетки, что позволяет снизить реактогенность препарата. В принципе к химическим вакцинам можно отнести и анатоксинвакцины.

Живые вакцины — искусственно ослабленные или природные авирулентные (слабовирулентные) штаммы возбудителя, которые утратили способность вызывать у естественно-восприимчивых животных болезнь, но могут в течение определенного промежутка времени размножаться в организме вакцинированного животного, вызывая иммунный ответ. Два основных требования к вакцинным штаммам: 1) отсутствие склонности к реверсии (возвращению в исходное вирулентное состояние); 2) неконтагиозность (возбудитель вакцинного штамма не должен передаваться от вакцинированного животного к невакцинированному). Желательно, чтобы вакцинный штамм нес стабильный маркер, отличающий его от эпизоотических штаммов возбудителя.

Искусственного ослабления вирулентности штамма (аттенуация) достигают многократными пассажами штамма через питательные среды, организм невосприимчивых животных, воздействием физических, химических факторов. Достаточно широко стали применять в качестве вакцинных штаммов ауksотрофные

мутанты, не способные синтезировать некоторые жизненно важные соединения, и поэтому, обеспечив иммунный ответ, довольно быстро погибающие в организме животного.

Генно-инженерные вакцины получают, искусственно вводя в клетку микроорганизма определенный ген (например, контролирующий синтез определенного фактора патогенности или другого протективного антигена), что в конечном итоге обеспечивает необходимую иммуногенность вакцинного препарата. В качестве передатчика генов (вектора) обычно используют плазмиды или фаги.

Адьюванты (англ. *adjuvant* — помогающий) широко используют при конструировании вакцин. Это вещества антигенной и неантигенной природы, различные по химическому составу, которые при совместном с антигеном введении в организм вызывают неспецифическое стимулирование иммуногенеза. Из адьювантов неорганической природы наиболее часто используют гидроксид алюминия — минеральный гель; алюмокалиевые квасцы, хорошо сорбирующие антигены.

К числу наиболее сильных адьювантов относят легкие минеральные масла со стабилизатором — безводным ланолином. Вакцины с такими адьювантами называют эмульгированными (масляными).

Приготовление адьювантных вакцин состоит в добавлении к готовому микробному антигену соответствующего адьюванта в предварительно установленных оптимальных пропорциях.

Контроль вакцин. Вакцины всех типов после приготовления проверяют в основном по трем параметрам.

Стерильность (инактивированные) или чистоту роста (живые) контролируют посевом на питательные среды.

Безвредность проверяют введением вакцины тем или иным лабораторным животным. Вакцина не должна вызывать заболевание и гибель животных.

Активность (иммуногенность) обычно контролируют следующим образом: вакцину вводят группе лабораторных животных, и через промежуток времени, достаточный для выработки активного иммунитета (15...20 сут), эту группу вместе с контрольной группой непривитых животных заражают заведомо летальной дозой возбудителя. Контрольные животные должны погибнуть, 80% и более вакцинированных должны выжить. В некоторых случаях об иммуногенности препарата судят по косвенным показателям: количеству агглютининов у привитых животных (лептоспирозная вакцина), антитоксинов в РН (вакцина против ботулизма).

Например, сухую живую вакцину против рожи свиней ВГНКИ из штамма ВР-2 контролируют следующим образом.

Для контроля чистоты сухую (лиофилизированную) вакцину разводят стерильным физиологическим раствором в соотноше-

нии 1 : 10. Из суспензии бактерий готовят мазки, красят по Граму, микроскопируют. В препарате должны быть типичные мелкие грамположительные палочковидные клетки при отсутствии посторонних микроорганизмов. Одновременно проводят высевы на МПА, МПБ, среду Китта—Тароцци и агар Сабуро. Посевы выдерживают при 37...38 °С 10 сут, посевы на грибы — при 20...25 °С 15 сут. Рост посторонней микрофлоры в указанные сроки на всех питательных средах должен отсутствовать при наличии типичного роста на МПА и в МПБ культуры возбудителя рожи.

С целью контроля вакцины на безвредность и активность 20 белым мышам массой 17...18 г вводят подкожно 0,2 мл препарата. Вакцину считают безвредной, если погибает не более 5 мышей. Через 14 дней всех оставшихся в живых вакцинированных и пять контрольных мышей заражают культурой вирулентного штамма возбудителя рожи свиней в заведомо летальной дозе. Вакцину признают активной, если погибают в течение трех-четырех суток контрольные и выживает не менее 75% вакцинированных мышей.

Лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины. Данные биопрепараты применяют для создания пассивного иммунитета при профилактике или лечении. Под пассивной иммунизацией понимают введение готовых иммуноглобулинов (антител) животному. Пассивный иммунитет возникает через 20...24 ч после инъекции и длится максимум две-три недели. Иммунные сыворотки получают путем многократного введения антигена животным-продуцентам (волам, лошадям и т. д.). Для получения каждого типа иммунных сывороток разработаны регламенты приготовления соответствующего антигена, схемы иммунизации и методы, с помощью которых контролируют количество антител в сыворотке крови.

По направленности действия иммунные сыворотки подразделяют на антибактериальные, антитоксические, антивирусные. По достижении необходимого уровня антител у животного берут кровь обычно в объеме 1% массы животного или осуществляют тотальное обескровливание. Полученную кровь сепарируют для получения сыворотки, которую стерилизуют фильтрованием и консервируют 0,25...0,5% фенола, 0,01...0,03% тиомерсала или другими веществами.

Контроль сывороточных препаратов. Включает в себя проверку на стерильность, безвредность и специфическую активность.

Стерильность препаратов проверяют посевом на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуро или Чапека).

Безвредность каждой серии обычно контролируют введением сыворотки морским свинкам. Специфическую активность сыворотки проверяют в зависимости от направленности ее действия.

Определение превентивных (защитных) свойств на естествен-

но-восприимчивых или лабораторных животных заключается в том, что животным вводят подкожно, внутримышечно или внутривенно сыворотку, а через 20...24 ч иммунизированным и контрольным животным вводят подтитрованную дозу гомологичного вирулентного микроорганизма. Иммунизированные животные должны остаться здоровыми при гибели или характерном переболевании контрольных.

Активность антитоксических и ряда противовирусных сывороток определяют в реакциях нейтрализации. Количество антител в сыворотках устанавливают при помощи различных серологических реакций (РСК, РА, РНГА, РДП и т. д.).

Пример контроля иммунной сыворотки (против рожи свиней).

Контроль стерильности: сыворотку высевают на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуру. Посевы выдерживают при 37 и 20 °С (Сабуру) десять дней. Среды должны остаться стерильными.

Контроль безвредности: пяти белым мышам массой 17...20 г вводят подкожно по 0,5 мл сыворотки, двум морским свинкам массой 250...300 г — по 10 мл. Все привитые животные должны остаться живыми в течение десяти дней.

Контроль активности: пятнадцати белым мышам массой 17...20 г вводят внутривенно по 0,01, 0,02 и 0,03 мл (по пять мышей на дозу) сыворотки. Через 2 ч всем привитым и пяти непривитым мышам вводят подкожно 0,1...0,2 мл суточной культуры вирулентного штамма возбудителя рожи свиней, разведенной 1:200. Сыворотку считают активной, если в течение десяти дней все привитые животные остаются живыми, а контрольные погибают (допускается гибель двух белых мышей, привитых в дозе 0,01 мл).

Для концентрирования антител иммунной сыворотки, удаления серологически неактивных белков и соответственно повышения специфической активности препарата применяют методы, с помощью которых выделяют глобулиновую фракцию белков иммунной сыворотки. Готовые препараты иммуноглобулинов контролируют, как и иммунные сыворотки: на стерильность, безвредность и специфическую активность.

Диагностические антитела. Принцип получения диагностических иммунных сывороток такой же, как и лечебно-профилактических. Диагностические сыворотки должны характеризоваться не только высокой активностью в серологических реакциях, но и специфичностью. С помощью диагностических сывороток обнаруживают микробные антигены в тканевых материалах и идентифицируют выделенные микроорганизмы. В зависимости от целевого назначения можно говорить о видовых сыворотках (предназначенных для идентификации микроорганизмов на уровне вида), групповых (идентификация на уровне серологической группы), серовариантных (на уровне серовара). Иммунные сыворотки готовят для использования в различных серологических

реакциях (РА, РП, РДП, РСК, РНГА, РН). При получении антител, меченных флуорохромом и ферментами, из иммунных сывороток предварительно выделяют и очищают иммуноглобулиновую фракцию. В целом диагностические сыворотки (антительные диагностикумы) контролируют на стерильность, активность и специфичность.

Пример контроля диагностической сыворотки (люминесцирующей сальмонеллезной). Определение активности (красящий титр): схема титрования сальмонеллезной сыворотки показана в таблице 16.

16. Определение активности флуоресцирующей сальмонеллезной сыворотки

| Компонент | Количество компонента (мл) в лунке планшета | | | | | | |
|--|---|--|------|------|------|------|------|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й | 5-й | 6-й | 7-й |
| Физиологический раствор | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Флуоресцирующая сыворотка одной из серогрупп | 0,2 | Последовательный перенос по 0,2 мл* начиная с 1-й пробирки | | | | | |
| Полученное разведение | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:28 |
| Интенсивность свечения клеток | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | + | - |

* Из последней пробирки убирают 0,2 мл. Красящий титр 1:32 (рабочий 1:16).

Из 24-часовых агаровых гомологичных культур сальмонелл готовят мазки (негустые), фиксируют их, затем на каждый мазок наносят различные разведения флуоресцирующей сыворотки. В дальнейшем препараты обрабатывают, как описано в теме 18.

Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом. Максимальное разведение сыворотки, обеспечивающее свечение гомологичных микробных клеток на три-четыре креста, считают ее красящим титром. Рабочий титр, т. е. используемый в работе, равен половине красящего. Красящий титр для групповых сывороток должен быть не ниже 1:32, для комплексной — 1:16.

Контроль специфичности люминесцирующей сыворотки: аналогичным образом на предметных стеклах готовят мазки из гетерологичных сальмонелл и эшерихий (по несколько культур). Флуоресцирующую сыворотку используют в рабочем титре. Свечения гетерологичных микробов практически не должно быть.

Получение моноклональных антител. Обычные иммунные диагностические сыворотки, выпускаемые биофабриками, представляют собой смесь антител против различных антигенных детерминант возбудителя инфекционной болезни. Использование таких сывороток для идентификации возбудителя сопряжено с получением перекрестных реакций между сероварами одного вида и даже между различными видами микроорганизмов за счет общих антигенных детерминант. Избежать

таких нежелательных перекрестных реакций пытаются различными способами. Один из методов заключается в использовании в качестве антигенов для иммунизации животных-продуцентов компонентов клеток возбудителя, несущих преимущественно специфические антигены. Часто такие вещества получают, разделяя антигенную смесь фильтрованием через сефадексы.

Другое традиционное направление в получении специфических реагентов — метод адсорбции иммунных сывороток, когда перекрестно реагирующие антитела удаляют, насыщая сыворотку клетками антигенно родственных бактерий. Клетки бактерий связывают перекрестно реагирующие антитела и потом их вместе с антителами отделяют от адсорбированной сыворотки центрифугированием. Подобным образом получают адсорбированные агглютинирующие сыворотки для идентификации сальмонелл и некоторых других видов бактерий.

В качестве специфических антительных реагентов все чаще используют моноклональные антитела. Обычные диагностические сыворотки — поликлональные, поскольку содержат антитела, синтезированные разными линиями (клонами) В-лимфоцитов к различным антигенным детерминантам. Моноклональные антитела представляют собой иммуноглобулины, продуцируемые одним клоном клеток и реагирующие с определенным антигенным эпитопом микроорганизма.

Чтобы получить моноклональные антитела, изолируют и поддерживают линию лимфоцитов, синтезирующих антитела определенной специфической направленности. Клетки-продуценты антител не способны расти *in vitro*. Злокачественная опухоль (миелома) синтезирует в больших количествах аномальные иммуноглобулины и способна к неограниченному росту *in vitro*. Была разработана методика слияния клеток миеломы с лимфоцитами, при этом гибридная клетка (гибридома), как и опухолевая, способна к неограниченному росту и одновременно синтезирует антитела, как лимфоидная. Задача сводится к обнаружению клона клеток, продуцирующих антитела необходимой специфической направленности. Получение моноклональных антител включает в себя несколько этапов.

Известным антигеном иммунизируют животных. Затем из селезенки выделяют В-лимфоциты.

Проводят слияние (гибридизацию) В-лимфоцитов и миеломных клеток. Получают смесь лимфоцитов гибридных и миеломных клеток.

Смесь клеток культивируют в среде, содержащей ГАТ (гипоксантин—аминоптерин—тимидин), что приводит к гибели лимфоцитов и миеломных клеток, так как на указанной среде могут расти только гибридомы.

Гибридомные клетки рассеивают (клонировать) таким образом, чтобы в лунке панели для микрокультивирования оказалась толь-

ко одна клетка, дающая начало клону. После размножения клеток оценивают их способность синтезировать нужные антитела (проводят скрининг). Клонирование повторяют. В конечном итоге выбирают стабильный клон, продуцирующий антитела заданной специфичности.

Клетки гибридом можно длительно хранить в замороженном состоянии (в жидком азоте).

Моноклональные антитела выделяют либо из культуральной жидкости (клетки гибридомы выращивают *in vitro*), либо из асцитической (выращивание *in vivo*).

Моноклональные антитела используют для диагностики инфекционных болезней в иммуноферментном, радиоиммунном и иммунофлуоресцентном анализах.

Диагностические антитела. Предназначены для постановки различных серологических реакций с целью серодиагностики инфекционных болезней животных. В зависимости от типа серологической реакции антигены могут быть корпускулярными (РА, РСК), на носителях (эритроцитарные антигенные диагностикумы для РНГА), растворимые (РП, РДП). Технология приготовления антигенов разнообразна, но основой для антигенов любого типа служат исходные селекционированные, без признаков диссоциации культуры микроорганизмов.

Контроль диагностических антигенов при выпуске проводят по следующим параметрам.

Контроль стерильности (см. вакцины).

Антиген для серологических реакций должен находиться в определенной оптимальной концентрации, выраженной, например, количеством микробных клеток в 1 мл.

Активность антигена определяют в той или иной серологической реакции с заведомо положительной сывороткой. Антиген должен давать четкую положительную реакцию. В некоторых случаях сначала устанавливают предельный титр антигена — разведение, в котором он дает положительную реакцию с наибольшим разведением стандартной положительной сыворотки. Для постановки серологической реакции при диагностических исследованиях используют рабочий титр антигена — двойную дозу предельного титра (единый бруцеллезный антиген).

Специфичность антигена испытывают в серологической реакции с заведомо отрицательной сывороткой.

Корпускулярные антигены для серологических реакций осадочного типа контролируют на спонтанную агглютинацию — выпадение в осадок в отсутствие антител.

Пример контроля диагностического антигена (бруцеллезного антигена для кольцевой реакции с молоком).

Используют клетки бруцелл стандартной концентрации, окрашенные гематоксилином.

Контроль стерильности: см. контроль вакцин.

Контроль специфичности и активности (табл. 17). Берут 10 проб свежего молока от здоровых коров. Молоко каждой пробы исследуют с разными количествами положительной бруцеллезной сыворотки.

17. Контроль диагностического бруцеллезного антигена на специфичность и активность

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | |
|------------------------------|---------------------------------------|------|------|------------------------------|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й (контроль специфичности) |
| Молоко | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 20%-й раствор хлорида натрия | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Бруцеллезная сыворотка | Перемешивают встряхиванием | | | |
| | 0,15 | 0,1 | 0,05 | — |
| Антиген | Перемешивают встряхиванием | | | |
| | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| | Инкубируют при 37...38 °С 2 ч | | | |

Антиген признают специфичным, если во всех пробирках, в которые не добавляли положительную сыворотку, получен отрицательный результат — молоко окрашено, заметно белое кольцо отстоявшихся сливок. Антиген признают активным, когда во всех трех пробирках каждой пробы с позитивной сывороткой или в пробирках с 0,15 и 0,1 мл сыворотки получен четкий положительный результат — молоко белое, слой сливок синего цвета.

Диагностические аллергены. Данные биопрепараты (бруцеллин, туберкулин, маллеин) представляют собой экстракты из клеток возбудителя и содержат продукты их метаболизма. Аллергическая диагностика основана на выявлении гиперчувствительности замедленного типа, которая развивается при ряде инфекционных болезней, особенно хронических. В основе этих диагностических тестов лежит специфическая реакция иммунного воспаления с участием сенсибилизированных Т-лимфоцитов.

Пример контроля диагностических аллергенов (бруцеллина, предназначенного для диагностики бруцеллеза).

Контроль стерильности: см. контроль вакцин.

Контроль безвредности: бруцеллин в объеме 0,5 мл вводят в область спины белым мышам массой 18...25 г. В течение десяти дней животные должны остаться живыми и без воспалительной реакции на месте инъекции.

Контроль специфичности: морским свинкам белой масти в депилированный участок боковой поверхности туловища внутрикожно вводят бруцеллин в объеме 0,1 мл и сравнивают с эталонным препаратом. При учете результатов через 24 и 48 ч на месте инъекции не должно быть аллергической реакции. Кроме

того, десяти здоровым овцам бруцеллин вводят под кожу нижнего века по 0,5 мл (пальпебрально) и внутрикожно в подхвостовую складку по 0,2 мл. Контролем также служит эталонный аллерген. Аллерген считают специфичным, если у здоровых животных аллергических реакций не возникает. Кроме того, проверяют аллерген на антигенные свойства, для этого у овец через 10...15 сут после введения аллергена исследуют в РА и РСК сыворотку крови — антител не должно быть.

Контроль активности: 10...15 белым морским свинкам вводят подкожно $(0,25...1) \cdot 10^9$ клеток штамма *B. melitensis* Rev-1 для аллергической сенсибилизации. Через четыре недели в депилированный участок кожи вводят 0,1 мл исследуемого бруцеллина и в качестве контроля эталонный аллерген. Реакцию учитывают через 24 ч, измеряя диаметр эритем (отека).

Интенсивность реакции на исследуемый и эталонный аллергены должна быть одинаковой.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести контроль чистоты и безвредности живой вакцины против рожи свиней из штамма ВР-2.
2. Изучить образцы инактивированных сорбированных, эмульгированных и живых вакцин.
3. Провести контроль активности и специфичности люминесцирующих сальмонеллезных сывороток.
4. Учесть результаты бруцеллиновой кожно-аллергической пробы на сенсибилизированных морских свинках.

Контрольные вопросы

1. Какие различают типы вакцин?
2. Что такое адьюванты?
3. Как контролируют вакцины, лечебно-профилактические и диагностические иммунные сыворотки?
4. В чем заключается преимущество диагностических препаратов на основе моноклональных антител?

Тема 21

ОТБОР, КОНСЕРВИРОВАНИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. ПРИНЦИПАЛЬНАЯ СХЕМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Цель занятия. Ознакомить студентов с общими правилами отбора, консервирования, транспортировки и хранения материалов для микробиологического исследования. Рассмотреть этапы микробиологического исследования.

Оборудование и материалы. Кролик, иглы для взятия крови, центрифужные пробирки, центрифуги, 96%-й этанол, ватные тампоны, глицерин, физиологический раствор, лед, поваренная соль, термос, термометр, труп животного (кролик, морская свинка), юветы с парафином или доски для вскрытия животных, пинцеты, ножницы, склянки для патологического материала, схемы бактериологического исследования при диагностике болезней бактериальной этиологии (бруцеллез, стафилококкоз и т. д.).

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Отбор материала для микробиологического исследования. Правильный отбор материала и его транспортировка в значительной мере определяют успех исследований.

Материал берут с учетом клинических признаков болезни, которые указывают на поражение той или иной системы, патолого-анатомической картины при вскрытии (изменения в различных органах — печени, легких, кишечнике и т. д.), а также основываясь на предполагаемом диагнозе, поскольку для каждой инфекции характерна определенная локализация возбудителя в организме.

Материал для исследования берут прижизненно или посмертно (от павших или убитых с диагностической целью животных). Во всех случаях желательно материал брать от животных, не подвергавшихся лечению антибиотиками, и в максимально короткие сроки после их гибели, так как через 2...3 ч после смерти нормальная микрофлора начинает проникать в органы и ткани, что затрудняет выделение возбудителя в виде чистой культуры. Чтобы избежать контаминации посторонней микрофлорой, исследуемый материал берут стерильно, с использованием стерильного инструмента и посуды для транспортировки.

Группы мелких животных направляют в лабораторию целиком.

Паренхиматозные органы и их фрагменты (у крупных животных) берут, соблюдая требования асептики. Каждый орган (фрагмент) помещают в стерильную посуду, транспортируют в нативном виде или консервируют одним из способов.

Трубчатые кости очищают от мышц, сухожилий, заворачивают в ткань, смоченную 5%-м раствором фенола, или пересыпают поваренной солью и затем заворачивают в ткань.

Гной, пунктаты органов, экссудат берут при помощи стерильного ватного тампона, шприца.

Кровь рекомендуют брать при лихорадочных состояниях стерильным шприцем в количестве 15...20 мл. Кровь, а также другие жидкие материалы можно отбирать стерильной пастеровской пипеткой с последующим запаиванием ее кончика.

Моча: наружные половые органы обмывают, ополаскивают стерильным физиологическим раствором, осушают стерильным марлевым тампоном. Первую порцию мочи не берут, последующую в необходимом количестве набирают в стерильную посуду.

Мокрота: собирают до приема корма. Из трахеи берут при помощи стерильного трахеотубуса и стерильного ватного тампона на проволоке. При глубоком (до бифуркации) введении тампона возникает кашель и удается получить бронхиальную слизь. Тампон с материалом помещают в пробирку со стерильным физиологическим раствором. При взятии материала из носоглотки используют специальные приборы, носоглоточные тампоны на изогнутой проволоке, носовые ватно-марлевые тампоны.

Секрет молочной железы: сосок обмывают водой, обрабатывают этанолом, ополаскивают стерильным физиологическим раствором, сцеживают и удаляют первую порцию секрета, для микробиологического исследования берут последующие порции молока.

Спинальная жидкость: обычно берут при наличии менингоэнцефалитического синдрома путем пункции.

Кишечник: если исследуют содержимое кишечника, то пересылают отдельные отрезки (сегменты) кишечника, перевязанные на концах лигатурами. В остальных случаях интересные отрезки кишечника освобождают от содержимого, промывают стерильной водой и помещают в банку со стерильным 30%-м водным раствором глицерина или насыщенным раствором хлорида натрия. Кишечник отправляют в лабораторию вместе с регионарными лимфатическими узлами.

Фекалии берут стерильными ватными или ватно-марлевыми ректальными тампонами, которые вводят на 8...10 см в прямую кишку, а затем помещают в стерильную пробирку. Если нет возможности сразу сделать посев, используют консервирующие смеси. В противном случае нарушается исходное количественное соотношение микробных видов и размножение некоторых бактерий может привести к инактивации искомого возбудителя.

Консервирование, транспортировка и хранение материала. Материал помещают в стерильную стеклянную посуду (пробирки, флаконы, банки и т. д.), закупоривают.

При подозрении на особо опасные инфекции сосуды с материалом помещают в герметичный металлический пенал (ящик), который печатают.

Транспортировку и хранение материала до исследования проводят таким образом, чтобы предотвратить размножение сопутствующей микрофлоры и инактивацию искомого микроорганизма. С этой целью исследуемый материал (кусочки органов) помещают в стерильную смесь равных объемов глицерина и физиоло-

гического раствора или помещают в термос, содержащий: 1) снег или лед и поваренную соль (в соотношении 3:1), температура смеси — 15...—20 °С; 2) равные части сухого льда и этанола, температура смеси около —70 °С.

Для консервирования материала, содержащего энтеробактерии, используют смеси, в которых исследуемый материал должен составлять 1/3 общего объема.

Глицериновая смесь: глицерин — 500 мл, физиологический раствор — 1000 мл, рН смеси доводят до 7,8...8,0 добавлением 20%-го раствора гидрофосфата калия. Смесь стерилизуют дробно, текучим паром.

Фосфатная буферная смесь: дистиллированная вода — 1000 мл, дигидрофосфат калия — 0,45 г, гидрофосфат калия — 5,34 г. Стерилизуют при 121 °С 20 мин.

Для энтеробактерий используют также накопительные среды (селенитовая, магниевая, желчный бульон), которые должны составлять 4/5 общего объема. Независимо от способа консервирования фекалии транспортируют и сохраняют до посева при 2...6 °С.

В сопроводительном документе указывают: название и адрес хозяйства, фамилию ветеринарного работника, направляющего материал, вид животного, от которого материал получен, характер материала, на какую инфекцию необходимо исследовать. Кроме того, прилагают протокол патологоанатомического вскрытия и описание клинико-эпизоотологических данных.

Поступивший в лабораторию неконсервированный материал можно хранить при 4 °С 1...2 сут; консервированный в 50%-м растворе глицерина (кусочки органов) — несколько недель; для длительного хранения материал замораживают при —15...—20 °С.

Кровь для серологических исследований у крупного рогатого скота, овец, лошадей берут из яремной вены в стерильные бактериологические пробирки в количестве 10...15 мл, у свиней — из хвостовой, передней краниальной вен или глазного синуса, у птиц — из подкрыльцовой вен, у кроликов — из краевой ушной вены. Пробирки с кровью необходимо выдержать до формирования сгустка в тепле (1,5...2 ч), затем для отделения от стенок пробирки отвести сгусток стеклянной чистой палочкой или спицей. Для отстаивания сыворотки пробирки с кровью помещают в холодильник при 4...6 °С на 18...20 ч. После ретракции сгустка сыворотку крови переливают в серологические пробирки с резиновыми пробками. При необходимости сыворотку крови консервируют, добавляя в пробирку несколько крупинок борной кислоты, тиомерсал (конечное разведение 1:10 000), или замораживают.

Принципиальная схема микробиологического исследования. Диагностика инфекционных болезней включает в себя комплекс исследований: эпизоотологические, клинические, патологоана-

томические, микробиологические. При важности каждого из них и ценности именно комплексного подхода микробиологическое исследование особенно важно, поскольку с его помощью либо непосредственно обнаруживают этиологический (причинный) агент болезни, либо косвенными специфическими иммунологическими методами доказывают его присутствие.

Микробиологическое исследование в принципе состоит из следующих этапов.

1. Обнаружение возбудителя непосредственно в исследуемом материале без изоляции в виде чистой культуры на питательных средах. На этом этапе применяют разные методы.

Неиммунологические методы включают в себя: а) выявление возбудителя путем микроскопического исследования окрашенных (по Граму и т. д.) мазков-отпечатков из органов и тканей; б) обнаружение при помощи генетических методов (генные зонды, ПЦР) нуклеиновых кислот возбудителя.

Иммунологические методы заключаются в выявлении антигенов возбудителя с помощью различных серологических реакций (РП, РДП, МФА, ИФА, РНГА и т. д.).

2. Обнаружение возбудителя (его токсинов) в биопробе (заражают исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных).

3. Выделение культуры возбудителя из исследуемого материала путем посева на питательные среды.

4. Идентификация выделенной культуры микроорганизмов по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и патогенных свойств. При этом широко используют серологические (РА, РП, РДП, ИФА и т. д.), а в случае необходимости генетические методы идентификации изолированных микроорганизмов.

5. Серологическая (ретроспективная) диагностика заключается в том, что при помощи различных серологических реакций (РА, РСК, ИФА и т. д.) в сыворотке крови исследуемых животных обнаруживают специфические следы пребывания возбудителя — антитела. Серологические реакции наиболее широко применяют при диагностике хронически протекающих бактериозов.

6. Аллергическое исследование в отличие от перечисленных выше методов проводят непосредственно на животных в хозяйстве. При помощи диагностических аллергенов у животных выявляют состояние гиперчувствительности замедленного типа. Аллергическую пробу в основном применяют для иммунологической диагностики хронических бактериозов.

Изложенная схема отражает возможные, но не обязательные направления микробиологических исследований. При каждой конкретной инфекции схему исследования определяют особенности биологии возбудителя и инфекционного процесса.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Освоить методику взятия материала из трупа животного (кролик, морская свинка).

2. Приготовить консервирующие смеси различного типа (глицерин, физиологический раствор, лед и поваренная соль) и провести консервирование материалов различного типа.

3. Освоить технику взятия крови у кролика и получения сыворотки крови.

Контрольные вопросы

1. Какой материал берут прижизненно и какой посмертно у животных для микробиологического исследования?

2. Какие методы консервирования материала применяют для микробиологического исследования?

3. Какова схема микробиологического исследования?

Раздел III

ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Тема 22

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОЗОВ И СТРЕПТОКОККОЗОВ. БИОПРЕПАРАТЫ

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

Оборудование и материалы. Культуры *S. aureus* и *S. saprophyticus* на МПА, кровяном МПА, в МПБ, результаты тестов по определению патогенных свойств стафилококков: ферментация маннита, плазмокоагулазная, гемолитическая, лецитиназная, ДНК-азная, желатиназная активность, культуры *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* (или *S. pyogenes*) на глюкозо-сывороточном МПА, МПБ, на средах Гисса с углеводами, пипетки Пастера; стерильные МПБ и кровяной МПА, красители для окраски по Граму и на капсулы, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

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

Лабораторная диагностика стафилококкозов основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики берут раневой экссудат стерильными ватными тампонами, со-

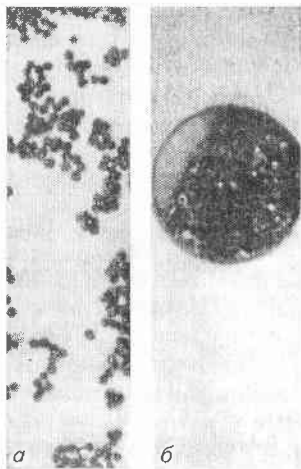


Рис. 72. *S. aureus*:

а — морфология клеток в культуре;
б — колония

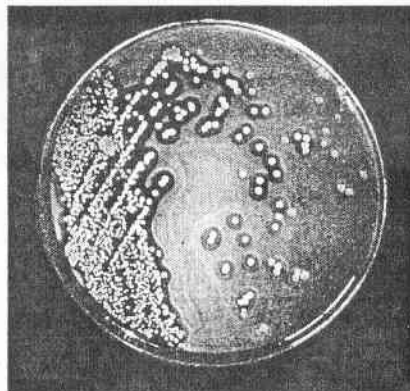


Рис. 73. Колония *S. aureus* на кровяном агаре

держимое абсцессов отбирают стерильным шприцем, при маститах материалом служит секрет вымени.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму и на капсулу, микроскопируют. Клетки стафилококков грамположительные, сферической формы, диаметром 0,5...1 мкм, располагаются в виде скоплений неправильной формы, а также единично, парами и цепочками из трех-четырех клеток (рис. 72), спор нет, вирулентные штаммы могут образовывать капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Стафилококки — факультативные анаэробы, температурный оптимум 30...37 °С, рН 7,2...7,4, к питательным средам неприхотливы, могут расти при повышенном содержании хлорида натрия. Исследуемый материал высевают на МПА, в МПБ, посевы культивируют в условиях обычной атмосферы. При загрязнении материала посторонней микрофлорой используют питательные среды с селективными свойствами: солевые МПА, МПБ (8...10 % хлорида натрия), желточно-солевой агар (ЖСА), 3,5%-й МПА с добавлением 3 мл 0,1%-го раствора кристаллвиолета (на этой среде патогенные стафилококки образуют колонии фиолетового или оранжевого цвета). Широко используют посев исходного материала на кровяной МПА.

На плотных средах через 18...24 ч инкубирования вырастают колонии правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, диаметром 2...7 мм, непрозрач-

ные. Цвет колоний зависит от типа вырабатываемого пигмента. *S. aureus* синтезирует золотистый и белый пигмент. На кровяном МПА вирулентные штаммы обычно растут, формируя широкую зону бета-гемолиза (рис. 73). На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком. В МПБ рост стафилококков сопровождается интенсивным помутнением среды и образованием значительного осадка.

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

Патогенные стафилококки в отличие от непатогенных образуют капсулу (*S. aureus*), выделяют гемолизин, фибринолизин (стафилокиназу), гиалуронидазу, плазмокоагулазу, желатиназу, ДНК-азу, лецитиназу, ферментируют маннит. Методы выявления этих факторов патогенности изложены в теме 13. Важнейшим из перечисленных факторов считают плазмокоагулазу: у 90...95 % плазмокоагулирующих стафилококков выражена способность продуцировать энтеротоксин.

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

Биопроба. Заражают лабораторных животных для подтверждения токсигенных свойств выделенного стафилококка.

♦ **Летальный токсин** выявляют внутривенным введением кролику фильтрата бульонной культуры 0,75 мл на 1 кг массы.

Некротоксин обнаруживают внутрикожной пробой. Готовят суспензию суточной культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $4,2 \cdot 10^9$ /мл и $1 \cdot 10^9$ /мл. Каждое разведение культуры по 0,1 мл вводят внутрикожно кролику, предварительно удалив шерстный покров на месте инъекции. Результаты учитывают ежедневно на протяжении 4...5 сут. В положительных случаях развивается некроз кожи.

♦ Энтеротоксин продуцируют токсигенные штаммы. Пробу на энтеротоксин ставят при отравлениях. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8 % агар-агара, рН 7,2), в атмосфере, содержащей 20 % оксида углерода (IV), в течение трех суток. Затем культуру стерилизуют фильтрованием,

10...15 мл фильтрата смешивают с равным объемом молока и скармливают 4...8-недельным котятам. При наличии энтеротоксина через 1..2 ч у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвота.

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

Лабораторная диагностика стрептококкозов основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. При подозрении на мыт прижизненно берут носовые истечения, содержимое абсцессов лимфатических узлов (путем пункции), для посмертной диагностики — кровь из сердца, части печени, селезенки, легких. При стрептококковых маститах исследуют молоко, при подозрении на септические стрептококкозы (диплококковая инфекция и др.) — кровь из сердца, селезенку, печень, костный мозг, носовые истечения.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму и на капсулу, микроскопируют. Все стрептококки представляют собой сферические или овальные грамположительные клетки диаметром 0,5...1,25 мкм, без спор и жгутиков, с тенденцией к образованию цепочек различной длины (рис. 74, 75). Морфология стрептококков некоторых видов в препаратах из патологического материала несколько отличается. У *S. pneumoniae* клетки обычно парные, окруженные капсулой, концевые части клеток слегка удлинены, поэтому данный стрептококк ранее называли ланцетовидным диплококком. Клетки *S. pneumoniae* также могут располагаться единично и короткими цепочками. *S. equi* в мазках из гноя обнаруживают в виде длинных цепочек, причем клетки в цепочке как бы сплюснены в гори-

зонтальной плоскости, образуют капсулу; в мазках из культуры клетки *S. equi* чаще располагаются короткими цепочками, единично, парами. *S. agalactiae* и *S. pyogenes* в препаратах из материала чаще обнаруживают в виде цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Стрептококки — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37 °С (диапазон 25...45 °С). На общепринятых питательных средах растут плохо, обычно используют обогащенные среды: МПБ с 1 % глюкозы и 10 % инактивированной сыворотки крови лошади, МПА с 1 % глюкозы и 5 % крови барана или кролика. Для выделения культуры возбудителя исследуемый материал высевает на указанные питательные среды и культивируют 18...24 ч.

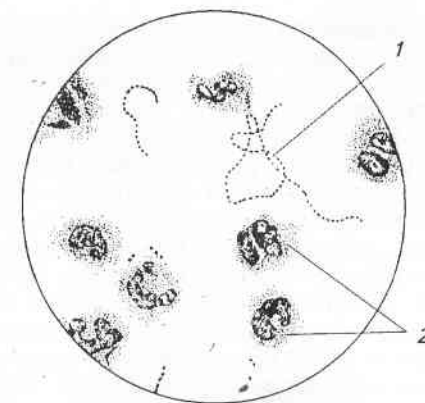


Рис. 74. *S. equi* в гное из лимфатического узла:

1 — стрептококк; 2 — лейкоциты

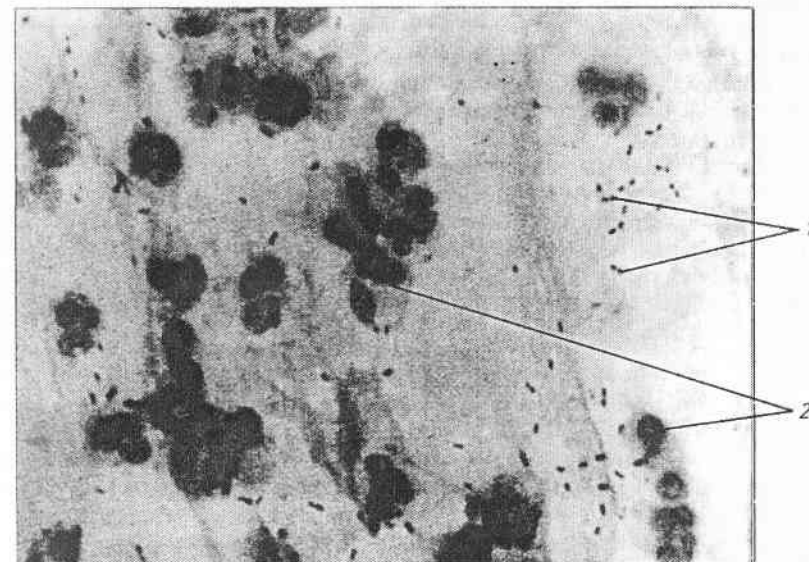


Рис. 75. *S. pneumoniae* в мазке из мокроты:

1 — стрептококки (диплококки); 2 — лейкоциты

На глюкозо-кровяном МПА все виды патогенных стрептококков образуют мелкие колонии, чаще с зоной гемолиза. У *S. pneumoniae* колонии круглые, полупрозрачные, плоские, с приподнятым центром и краями, с зоной гемолиза типа «альфа»; в МПБ растет с равномерным помутнением среды. *S. equi* формирует мелкие, росинчатые, слизистые, правильной круглой формы колонии с узкой зоной бета-гемолиза, позднее они становятся серо-белыми, непрозрачными; в МПБ растет с помутнением среды, образованием пушистых хлопьев, через 3...5 сут культивирования бульон просветляется, на дне пробирки образуется осадок. У *S. agalactiae* (*S. dysagalactiae*) мелкие, сероватые, просвечивающие колонии с бета- или двойной зоной альфа-гемолиза, при росте в МПБ среда остается прозрачной, формирующиеся крупинки оседают на дно пробирки. *S. pyogenes* на кровяном МПА образует мелкие, прозрачные, правильной круглой формы колонии с зоной бета-гемолиза, в бульоне растет с просветлением среды и выпадением зернистого осадка.

На следующем этапе из выделенных культур готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении типичных по морфологии и тинкториальным свойствам клеток бактерий переходят к следующему этапу.

Чтобы исключить стафилококковую, энтерококковую (род *Enterococcus*) инфекции, чистую культуру исследуют в нескольких пробах. Ставят тест на каталазу — стафилококки образуют каталазу, стрептококки нет. С целью дифференциации пиогенных гемолитических стрептококков от энтерококков культуры высевают в МПБ, содержащий 40 % желчи крупного рогатого скота, МПБ с 6,5 % хлорида натрия. Энтерококки в отличие от гноеродных стрептококков растут на этих средах. Также проверяют чувствительность клеток культуры к желчи: в пробирку с МПБ, содержащим 10 % желчи крупного рогатого скота, вносят 0,5 мл исследуемой суточной бульонной культуры и выдерживают при 37 °С 1 ч. При лизисе содержимое пробирки просветляется, энтерококки не лизируются.

Параллельно изучают ферментативные свойства стрептококков (табл. 18).

18. Ферментативная активность патогенных стрептококков

| Признак | <i>S. pneumoniae</i> | <i>S. agalactiae</i> | <i>S. dysagalactiae</i> | <i>S. pyogenes</i> | <i>S. equi</i> | | |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|
| | | | | | sb. equi | sb. equisimilis | sb. zoepidemicus |
| Гидролиз: | | | | | | | |
| гиппурата | — | + | — | — | — | — | — |
| эскулина | d | — | — | — | — | — | — |
| аргинина | + | + | + | + | + | + | + |
| Образование кислоты из: | | | | | | | |
| лактозы | + | d* | + | + | — | d | + |

Продолжение

| Признак | <i>S. pneumoniae</i> | <i>S. agalactiae</i> | <i>S. dysagalactiae</i> | <i>S. pyogenes</i> | <i>S. equi</i> | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|----------------|-----------------|------------------|
| | | | | | sb. equi | sb. equisimilis | sb. zoepidemicus |
| раффинозы | + | — | — | — | — | — | — |
| салицина | — | d | d | + | + | нд** | нд |
| сорбита | — | — | d | — | — | — | + |
| трегалозы | + | + | + | + | — | + | — |
| Серологическая группа по Ленсфильд | Нет | B | C | A | C | C | C |

*d—варьирующие реакции.

**нд—нет данных.

Серогрупповую принадлежность выделенного микроба определяют в реакции преципитации. В РП используют стрептококковые групповые преципитирующие сыворотки. Исследуемую культуру выращивают в МПБ в течение 18...20 ч, затем 7...9 мл культуры центрифугируют, надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 0,3...0,4 мл 0,2 н. раствора соляной кислоты, осадок суспендируют, взвесь прогревают в кипящей водяной бане 10 мин, охлаждают, добавляют каплю 0,04%-го спиртового раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,2 н. раствором гидроксида натрия. Жидкость приобретает бледно-розовый цвет. Затем смесь вновь центрифугируют и надосадочную жидкость, содержащую термостабильный полисахаридный антиген С, используют как антиген для постановки реакции кольцепреципитации. По классификации Ленсфильд стрептококки на основании антигенных свойств полисахарида С можно отнести к той или иной серологической группе: А, В, С, D и т. д. *S. pneumoniae* не содержит серогрупповой полисахарид, но является антигенно-гетерогенным видом, который дифференцируют на типы в РА.

Биопроба. У выделенных культур стрептококков определяют патогенные свойства в биопробе на белых мышах. Для заражения используют только свежесделанные штаммы в виде 18...20-часовых бульонных культур, которые по 0,5 мл вводят внутривенно трем мышам. Культуру признают патогенной при гибели не менее двух мышей.

В случае инфекции, вызываемой *S. pneumoniae*, практикуют выделение возбудителя из исследуемого материала методом биопробы. С этой целью тканевую суспензию, разведенную стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:2, вводят внутривенно белым мышам по 0,5 мл. В положительных случаях мыши погибают через 1...2 сут.

Биопрепараты. Вакцину против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят готовят из штаммов *S. pneumoniae*, выде-

ленных от указанных видов животных. Культуры выращивают на полужидком агаре, инактивируют 0,4%-м раствором формалина, проверяют на стерильность, безвредность (на морских свинках), активность (на белых мышах).

Ассоциированная (поливалентная) вакцина против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят включает в себя кроме *P. multocida* и *S. choleraesuis* бактериальную массу *S. pneumoniae*.

Сыворотку против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят получают гипериммунизацией волов убитыми и живыми культурами возбудителя.

Инактивированные вакцины из стрептококков серологической группы С.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить мазки из культур стафилококков, стрептококков, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать культуральные свойства стафилококков и стрептококков.
3. Изучить ферментативные свойства стафилококков и стрептококков.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. По каким критериям дифференцируют патогенные и непатогенные стафилококки?
2. Каковы основные виды патогенных стрептококков?
3. По каким критериям дифференцируют гноеродные гемолитические и фекальные стрептококки?
4. Каковы культуральные, морфологические и тинкториальные свойства стрептококков?
5. Какие биопрепараты выпускают против диплококковой септицемии молодяка сельскохозяйственных животных?

Тема 23

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РОЖИ СВИНЕЙ И ЛИСТЕРИОЗА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с этапами лабораторной диагностики и свойствами возбудителей рожи свиней, листериоза, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культуры вакцинных штаммов возбудителя рожи свиней и листериоза на МПА, в МПБ с индикаторными бумажками на сероводород, культуры на средах Гисса с углеводами, перекись водорода, реактив Эрлиха, стерильные

МПА, МПБ в пробирках, пипетки Пастера, трупы мышей, павших после заражения вакцинными штаммами возбудителей, инструменты для вскрытия трупов животных, люминесцентный микроскоп, люминесцирующие сыворотки листериозные и рожистые, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Рожа свиней. Инфекционная болезнь, преимущественно свиней в возрасте 3...12 мес. Спорадически встречается у крупного рогатого скота, ягнят, пушных зверей, грызунов, птицы; восприимчив человек. Болезнь протекает остро и хронически. Острое течение характеризуется признаками септицемии, воспалительной эритемой, хроническое — эндокардитами и артритами.

Возбудитель рожи свиней — бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*, род *Erysipelothrix*.

Лабораторная диагностика рожи свиней основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют труп животного целиком или сердце (при хроническом течении обязательно), печень, селезенку, почку, трубчатую кость. Материал не консервируют или помещают в стерильный 30%-й раствор глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой прямую или слегка изогнутую тонкую палочковидную грамположительную бактерию без спор, капсул и жгутиков размером $(0,2...0,3) \times (0,8...2,5)$ мкм (рис. 76). Мазки-отпечатки из органов окрашивают по Граму и противорожистой люминесцирующей сывороткой. В положительных случаях в материале находят мелкие грамположительные палочки, располагающиеся одиночно, попарно или в виде скоплений. В препаратах из пораженных клапанов сердца при хроническом течении болезни возбудитель обнаруживают в форме нитей. В мазках, окрашенных люминесцирующей сывороткой, в положительных случаях находят светящиеся клетки бактерий типичной морфологии.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель рожи — факультативный анаэроб, в первых поколениях ведет себя как микроаэрофил. Температурный оптимум 36...37 °С, pH 7,2...7,5. С целью выделения культуры возбудителя исследуемый

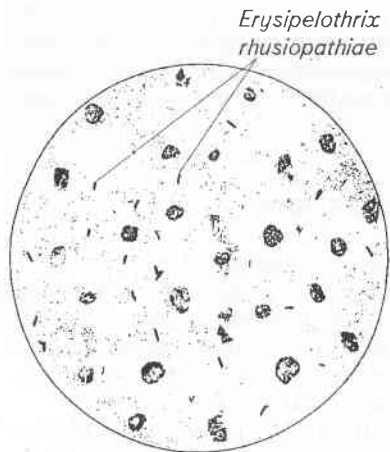


Рис. 76. Возбудитель рожи свиней в мазке-отпечатке

материал засевают в МПБ или на МПА. Посевы культивируют 24...48 ч.

В МПБ возбудитель растет с очень слабым помутнением питательной среды, без образования пристеночного кольца или поверхностной пленки, через 48...72 ч среда просветляется, на дне пробирки формируется незначительный осадок, поднимающийся при встряхивании в виде облачка. На плотных средах возбудитель образует мелкие росинчатые колонии (*S*-форма), иногда крупные, с неровными краями и поверхностью (*R*-форма). Посевы на плотных средах из-за малых размеров колоний лучше просматривать при помощи

лупы. Из культур, выросших на питательных средах, готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму и люминесцирующей сывороткой. При обнаружении бактерий, типичных для возбудителя рожи свиней по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам, у выделенных культур изучают ферментативные, серологические и патогенные свойства.

Возбудитель рожи разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу; не ферментирует эскулин, сахарозу, маннит, дульцит, рамнозу; не образует каталазу, индол; выделяет сероводород; не растет в МПБ с 8,5 % хлорида натрия; вирулентные штаммы синтезируют гиалуронидазу.

Вид *E. rhusiopathiae* подразделяют на 22 серовара, которые обозначают цифрами. Наиболее распространены серовары 1-й и 2-й, которые ранее обозначали А и В. Для видовой серологической идентификации на практике используют обычную лечебно-профилактическую противорожистую сыворотку (см. «Биопрепараты»).

На предметное стекло наносят каплю иммунной сыворотки, разведенной физиологическим раствором (1:50), в которой затем тщательно суспендируют бактериологической петлей суточную агаровую исследуемую культуру. Через 1...2 мин учитывают результат: возбудитель рожи агглютинирует в сыворотке.

Биопроба. Метод применяют для изоляции возбудителя из исследуемого материала, а также для определения патогенных свойств выделенных культур бактерий. Тканевый материал измельчают в ступке со стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вводят подкожно по 0,1...0,2 мл белым мышам массой 16...18 г. При наличии возбудителя животные погибают через

2...4 сут после заражения. Заражение мышей слабовирулентными культурами, например выделенными от свиней с хроническим течением болезни, может приводить к гибели животных в более поздние сроки или не вызывать летального исхода. Материал из трупов мышей подвергают бактериологическому исследованию.

Биопрепараты. Концентрированная гидроокисьалюминиевая формолвакцина против рожи свиней содержит культуры возбудителя серовара В, выращенные в бульоне Хоттингера, инактивированные формалином, сорбированные на гидроксиде алюминия. После формирования осадка вакцину концентрируют, сливая треть надосадочной жидкости. Вакцину контролируют на стерильность, безвредность и активность (на голубях).

Депонированная вакцина против рожи свиней представляет собой живую культуру матрикса Конева, сорбированную на гидроксиде алюминия. Вакцину контролируют на чистоту роста, безвредность и остаточную вирулентность (считают пригодной для использования, если вакцина безвредна для голубей и вирулентна для мышей).

Сухая живая вакцина против рожи свиней ВГНКИ из штамма ВР-2 представляет собой лиофильно высушенную культуру вакцинного штамма ВР-2. Вакцину контролируют на чистоту роста, концентрацию микробных клеток ($5 \cdot 10^9$ /мл), безвредность и активность на белых мышах. Так же готовят жидкую вакцину из штамма ВР-2.

Лечебно-профилактическую сыворотку против рожи свиней получают гипериммунизацией свиней; контролируют на стерильность, безвредность и активность на белых мышах и признают активной, если она предохраняет от гибели мышей в дозах 0,01...0,02 и 0,03 мл.

Сухие рожистые люминесцирующие сыворотки для прямого метода иммунофлуоресценции предназначены для серологической идентификации возбудителя непосредственно в материале и в культуре.

Листерия. Бактериальная инфекция сельскохозяйственных животных многих видов, грызунов, птиц и человека. Характеризуется поражением центральной нервной системы, репродуктивных органов (аборт), молочной железы (мастит), признаками септицемии. Протекает остро и хронически.

Возбудитель листериоза — бактерия *Listeria monocytogenes*, род *Listeria*.

Лабораторная диагностика листериоза основана на результатах бактериологического исследования, в отдельных случаях применяю серологическую диагностику.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой и люминесцентной микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим,

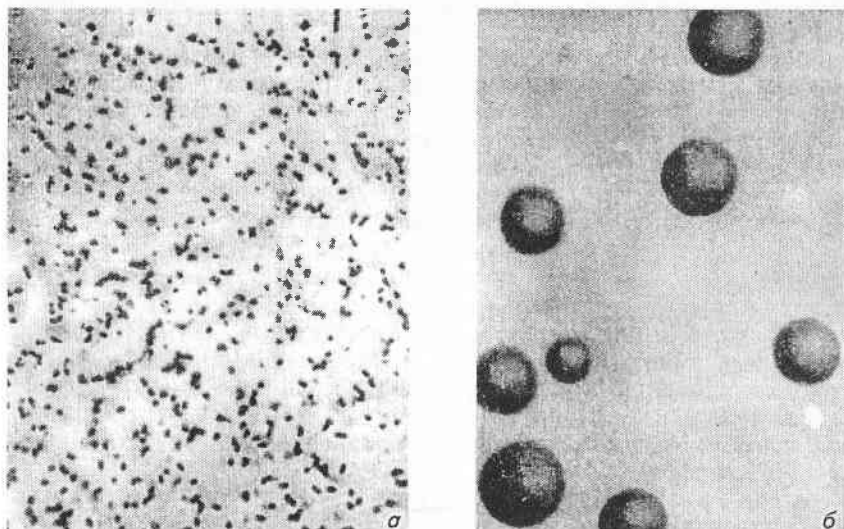


Рис. 77. Листерии:

а — *L. monocytogenes* в препарате из чистой культуры (× 1000); б — колонии листерий на МПА (× 35)

ферментативным, серологическим и патогенным признакам (методом биопробы).

Материал для исследования. В лабораторию направляют трупы мелких животных (целиком), от крупных животных: голову (головной мозг), печень, селезенку, почки, пораженные участки легких; для прижизненной диагностики — абортированный плод с оболочками, истечения из половых органов, секрет пораженной доли вымени, в случае необходимости кровь или сыворотку крови от больных или подозреваемых в заболевании животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой грамположительную палочковидную бактерию с закругленными концами, без спор, размером 0,5...2 мкм (рис. 77). Листерии при 20...22°C, но не при 37...38°C образуют жгутики. При выращивании на сывороточных средах формируют капсулу. Из исследуемого материала готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, а также флуоресцирующими листериозными сыворотками. В тканевом материале листерии обнаруживают в виде грамположительных, нередко полиморфных палочек, располагающихся одиночно, парами, напоминающими римскую цифру пять, или по несколько штук параллельно.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Листерии — факультативные анаэробы, температурный оптимум 36...38°C, диапазон 4...45°C, способны расти на средах с повышенным содержанием хлорида натрия. Посевы из исследуемого материала делают в

МПБ или печеночный бульон и на агар с добавлением глюкозы (1%) и глицерина (2...3%), на кровяной агар. При исследовании загрязненного материала используют среды с селективными свойствами: МПА с теллуридом калия и полимиксином, среды, содержащие 10% хлорида натрия. Для увеличения концентрации возбудителя в исследуемом материале рекомендуют часть материала хранить при 4°C до 30 сут. При получении отрицательных результатов в первичных посевах следует с интервалом 10 сут делать повторные высевы на среды, что увеличивает вероятность выделения возбудителя. Посевы инкубируют при 37°C до двух недель.

На плотных питательных средах возбудитель растет в виде мелких росинчатых колоний, в косопроходящем свете — голубоватого цвета с зеленоватым оттенком и мелкозернистой структурой; на кровяном агаре вокруг колоний некоторых штаммов образуется зона бета-гемолиза. В МПБ рост возбудителя характеризуется слабым помутнением среды, через 5...7 дней на дне пробирки образуется слизистый осадок.

Для изучения подвижности культуру засевают уколом в полужидкий агар (0,2%), посевы культивируют при 20...22°C. Сначала возбудитель растет по уколу, затем рост распространяется по всему столбику питательной среды (подвижен). У выделенных культур бактерий изучают морфологические и тинкториальные свойства клеток, ферментативную активность.

Листерии разлагают с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, рамнозу, салицин, трегалозу, выделяют каталазу, обесцвечивают при росте в МПБ ряд красителей (индикаторные среды с метиленовым синим, нейтральротом, метилротом, конгоротом, амидо черным в концентрации 0,001...0,003%). Пробирки с индикаторными средами засевают исследуемой культурой, помещают в термостат при 37°C и учитывают результат через 3, 6, 24 и 48 ч. Помимо *L. monocytogenes* могут быть выделены другие виды листерий (*L. denitrificans* редуцирует нитраты, разлагает сахарозу и арабинозу; *L. ivanonii* постоянно ферментирует лактозу, не утилизирует рамнозу, образует двойную или тройную зону гемолиза на кровяном агаре. Оба вида листерий патогенны для мышей).

Для дифференциации листерий от возбудителя рожи свиней используют следующие критерии (табл. 19).

19. Дифференцирующие признаки возбудителей листериоза и рожи свиней

| Признак | Возбудитель листериоза | Возбудитель рожи свиней |
|--|------------------------|-------------------------|
| Подвижность в молодой культуре | + | — |
| Ферментация салицина | + | — |
| Тест на каталазу | + | — |
| Обесцвечивание индикаторных сред с красителями | + | — |
| Конъюнктивная проба на морских свинках | + | — |
| Агглютинация в позитивной листериозной сыворотке | + | — |

По 14 соматическим и 5 жгутиковым антигенам листерии подразделяют на 16 основных серотипов (сероваров). По данным отечественных авторов, наиболее часто удается изолировать штаммы Первого серотипа.

Для видовой идентификации на предметное стекло наносят каплю поливалентной агглютинирующей сыворотки, в нее вносят суспензию 24-часовой агаровой культуры с концентрацией клеток $1 \cdot 10^{10}$ /мл. Результат учитывают через 3 мин. Поливалентная сыворотка агглютинирует все антигенные варианты возбудителя, контролем служит суспензия бактерий в капле физиологического раствора. На втором этапе при помощи серотиповых сывороток определяют серотип выделенного возбудителя.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения возбудителя в исследуемом материале и изучения патогенных свойств бактерий. В первом случае тканевой суспензией заражают двух-трех белых мышей подкожно или внутрибрюшинно по 0,3...0,5 мл. В положительном случае мыши погибают через 2...6 сут, особенно чувствительны 5...6-дневные мышата, которые гибнут через 18...36 ч. Павших животных подвергают бактериологическому исследованию.

Конъюнктивальную пробу ставят для дифференциации выделенной культуры от возбудителя рожи свиней. На конъюнктиву глаза морской свинки наносят две капли бульонной культуры изучаемой бактерии. Вирулентные листерии на 2...4 сут вызывают гнойный кератоконъюнктивит.

Серологическая диагностика: серологические методы применяют в хозяйстве, где уже поставлен диагноз на листериоз, для выяснения эпизоотической ситуации. Используют пробирочную РА и РСК. Диагностический титр РА для крупного рогатого скота и лошадей 1:400 (1:200 — сомнительный), для овец, коз и свиней — 1:200 (1:100 — сомнительный), для кроликов — 1:50 (1:25 — сомнительный). В РСК исследуют сыворотки крови, разведенные 1:10.

Биопрепараты. Сухая живая вакцина против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма АУФ представляет собой культуру лиофильно высушенного аттенуированного штамма листерий Первого серотипа. Вакцину контролируют на чистоту роста, безвредность и иммуногенность (на кроликах).

Листерииозные диагностические агглютинирующие сыворотки.

Листерииозные флуоресцирующие сыворотки. Разработана вакцина из двух серотипов листерий.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить мазки из культур вакцинных штаммов листерий и возбудителя рожи свиней, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.

2. Изучить культуральные и ферментативные свойства листерий и возбудителя рожи свиней.

3. Ознакомиться с биопрепаратами для специфической профилактики и диагностики листериоза и рожи свиней.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические, культуральные, ферментативные и патогенные свойства возбудителей рожи свиней, листериоза?

2. В чем состоит лабораторная диагностика рожи свиней и листериоза?

3. Какова антигенная структура возбудителей рожи свиней, листериоза и какие методы применяют для их серологической идентификации?

4. Какие методы используют для серологической диагностики листериоза?

5. Какие биопрепараты разработаны для специфической профилактики и диагностики листериоза и рожи свиней?

Тема 24

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА, ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА, АКТИНОМИКОЗА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей, методами лабораторной диагностики туберкулеза и паратуберкулеза, актиномикоза, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Суспензия микобактерий в смеси со стафилококками, эшерихиями (вакцина БЦЖ), культуры микобактерий на среде Петраньяни (Левенштейна—Иенсена), красители для окраски по методу Циля—Нильсена, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Туберкулез. Это хроническое инфекционное заболевание домашних и диких животных, в том числе птиц, а также человека. Характеризуется образованием туберкулов (бугорков) в различных органах и тканях. Наиболее восприимчивы к туберкулезу крупный рогатый скот, свиньи и куры.

Возбудителя туберкулеза относят к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*. Наибольшее значение в патологии сельскохозяйственных животных (и человека) имеют следующие виды: *M. tuberculosis* — возбудитель туберкулеза человека, *M. bovis* — возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота, *M. avium* — возбудитель туберкулеза птиц.

Лабораторная диагностика туберкулеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале (методом световой и люминесцентной микроскопии и биопробой), выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным признакам.

Материал для исследования. От павших или убитых с диагностической целью сельскохозяйственных животных берут лимфатические узлы — заглочочные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные, печеночные, надвымянные, а также кусочки печени, легких и селезенки. Тушки птиц направляют в лабораторию целиком — исследуют пораженные печень, легкие, селезенку, яичники. От живых животных берут пробы молока и спермы. При взятии патологического материала необходимо соблюдать правила личной безопасности.

Материал доставляют в лабораторию свежим, в замороженном виде или консервируют 30...40%-м водным раствором глицерина. Обсемененность патологического материала микобактериями туберкулеза может быть незначительной, поэтому для получения достоверных диагностических результатов специальными методами обработки повышают концентрацию возбудителя. К обработке предъявляют ряд требований: она должна обеспечивать гомогенизацию материала, уничтожить сопутствующую микрофлору, быть щадящей для микобактерий туберкулеза и способствовать их концентрации в материале (обогащение).

Кусочки органов и тканей измельчают, заливают 3...10%-м раствором серной кислоты в соотношении 1 : 4, пробу центрифугируют при 3000 мин^{-1} 10...15 мин. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии (перед посевом осадок можно дополнительно отмыть физиологическим раствором два-три раза путем центрифугирования).

Пробу молока (150 мл) центрифугируют при 3000 мин^{-1} 20...30 мин. Осадок обрабатывают 3...6%-м раствором серной кислоты 20...30 мин, тщательно взбалтывают и центрифугируют. Осадок высевают на питательные среды.

Яйца перед исследованием инкубируют в термостате при $37...38^\circ\text{C}$ 20 дней, после чего содержимое измельчают, обрабатывают 3...10%-м раствором серной кислоты, центрифугируют и осадок используют для посевов и микроскопии.

Для концентрирования микобактерий в исследуемом материале применяют метод флотации. Материал гомогенизируют с физиологическим раствором до консистенции сметаны и 10 мл гомогената вносят в колбу с узким горлом на 250 мл, добавляют 10 мл 1%-го раствора гидроксида натрия. Колбу закрывают и

смесь встряхивают в течение 10 мин. Затем смесь разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1 : 9 и прибавляют 1...2 мл ксилола (петролейного эфира или авиационного бензина), смесь вновь встряхивают в течение 5...10 мин, добавляют дистиллированную воду (до горлышка колбы) и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Микотуберкулезные бактерии концентрируются во флотационном кольце у горлышка колбы вместе с каплями ксилола, которые, всплывая на поверхность, увлекают за собой и микобактерии. Содержимое образовавшегося кольца используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии, нанося материал на стекло несколько раз по мере подсыхания.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Микобактерии — прямые или слегка изогнутые палочковидные клетки размером $(0,2...0,6) \times (1...10)$ мкм, без спор, капсул и жгутиков; грамм-положительные, кислото- и спиртоустойчивые. Кислотоустойчивость связана с присутствием в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты (до 60%). В цитоплазме располагаются кислотолabile гранулы, состоящие в основном из метафосфата (зерна Муха). Липиды и воскоподобные вещества придают микробной клетке гидрофобность, т. е. способность отталкивать воду и водные растворы красителей, кислот, щелочей, в связи с чем бактерии туберкулеза (и паратуберкулеза) плохо воспринимают окраску. Для окрашивания микобактерий применяют специальные методы, среди которых самый распространенный — метод Цилю—Нильсена. По Цилю—Нильсену микобактерии окрашиваются в ярко-красный цвет.

В препаратах *M. tuberculosis* обнаруживают в виде тонких прямых (изогнутых) палочек, *M. bovis* представляет собой короткие и толстые палочки, *M. avium* мельче остальных видов, со склонностью к полиморфизму (рис. 78).

Бактериоскопический метод отличается невысокой чувствительностью: с его помощью возбудитель выявляют при концентрации микобактерий $(1...5) \cdot 10^5$ /мл. Более результативна люминесцентная микроскопия (окраска аурамин-родамином), благодаря которой выявляют даже незначительное количество микобактерий, которые окрашены в бело-желтый

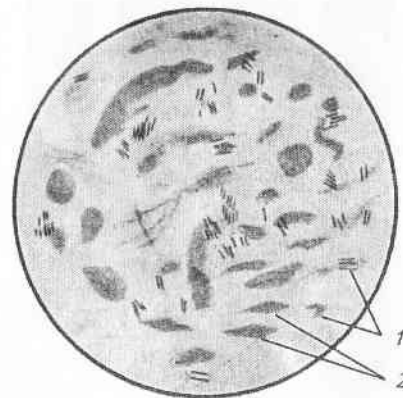


Рис. 78. Микобактерии в окрашенном препарате из мокроты:

1 — микобактерии; 2 — тканевые элементы

цвет, а также формы с измененными тинкториальными свойствами.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Микобактерии — аэробы, температурный оптимум 37...38 °С, рН 6,4...7. Растут медленно. Для культивирования микобактерий туберкулеза используют сложные питательные среды, содержащие глицерин, картофель, яйца, витамины. Рост бактерий стимулируют аспарагиновая кислота, альбумин, глюкоза, биотин, никотиновая кислота, соли аммония и др. Наиболее часто применяют среды Петраньяни, Левенштейна—Иенсена, Гельберга.

Рост микобактерий бычьего вида на плотных средах чаще обнаруживают на 20...60-е сутки, человеческого вида — на 14...40-е сутки, птичьего — на 10...20-е сутки (рис. 79).

M. bovis на плотных питательных средах формирует мелкие гладкие шаровидные колонии цвета слоновой кости, иногда с морщинистым сероватым налетом. На жидких средах образует пленку на поверхности сначала в виде единичных островков, позднее — сливающихся в сплошную пленку.

M. tuberculosis на плотных питательных средах дает рост в виде сухого морщинистого налета кремового цвета. У колоний приподнятый центр, они крошковидные, с приятным запахом, по виду напоминают цветную капусту, плохо смачиваются водой. На жидких средах рост наблюдают на 5...7-е сутки в виде сухой морщинистой пленки, поднимающейся на края пробирок, среда остается прозрачной. На жидких средах и при внутриклеточном развитии образуется корд-фактор (трегалоза-6,6-дипиколат), способствующий сближению бактериальных клеток в микроколониях и их расположению в виде серпантинообразных кос, что можно наблюдать при микроскопическом исследовании (рис. 80). В средах, содержащих детергент (твин-80), вследствие потери клетками гидрофобности наблюдают диффузный рост.

M. avium на плотных яичных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизис-

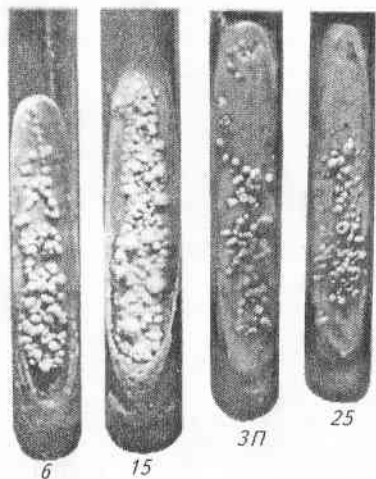
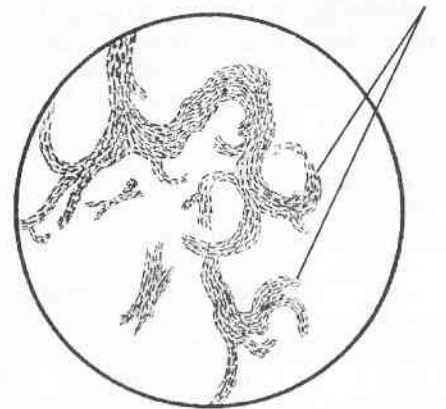


Рис. 79. 1,5-месячный рост микобактерий туберкулеза птичьего типа на среде Петраньяни (штампы № 6, 15, 31, 25)

Рис. 80. Серпантинообразное расположение клеток микобактерий в микрокультуре (корд-фактор)



тые, мягкие, серовато-белые, с возрастом желтеют, иногда образуют возвышение в виде пуговицы с кратерообразным углублением. При первичной изоляции из патологического материала колонии плоские и полупрозрачные. В жидких питательных средах возбудитель дает диффузный рост с формированием влажной жирной пленки и образованием рыхлого осадка. Биохимические свойства микобактерий указаны в таблице 20.

20. Биохимические признаки микобактерий

| Активность | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. avium</i> |
|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| Синтез уреазы | + | + | - |
| Редукция нитратов | + | - | - |
| Синтез каталазы | - | - | +/-* |
| Аккумуляция ниацина | + | - | - |
| Гидролиз твина (10 сут) | +/- | - | - |

* (+/-) — варьирующий признак.

Биопроба. Метод применяют не только для обнаружения возбудителя в исследуемом материале, но и для определения его видовой принадлежности. Биопробу ставят параллельно с культуральными исследованиями.

Для определения вида заражают двух морских свинок, двух кроликов, при необходимости и двух кур. Перед постановкой биопробы морским свинкам и курам проводят туберкулинизацию. В опыт берут животных, не реагирующих на введение туберкулина. Для заражения используют культуру или исследуемый материал, обработанный серной кислотой (см. «Материал для исследования»). Морским свинкам суспензию материала вводят по 1...2 мл подкожно в паховую область, кроликам — внутривенно, курам — в подкрыльцовую вену. За подопытными животными ведут наблюдение в течение трех месяцев. У морских свинок в положительных случаях через 2...3 нед в месте введения

образуется уплотнение, потом язва, увеличиваются регионарные лимфоузлы. Через 30 сут после заражения свинкам повторяют туберкулинизацию. При наличии клинических признаков заболевания и положительной реакции на туберкулин одну морскую свинку подвергают убою с последующим патологоанатомическим исследованием и приготовлением из пораженных органов мазков, которые окрашивают по методу Циля—Нильсена. При обнаружении в мазках микобактерий туберкулеза дают положительное заключение на туберкулез и биологическое исследование прекращают.

Возбудитель относят к тому или иному виду микобактерий, основываясь на следующих результатах биопробы (табл. 21).

21. Патогенность микобактерий для лабораторных животных

| Вид микобактерий | Морская свинка | Кролик | Куры |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>M. bovis</i> | Генерализованный туберкулез | Генерализованный туберкулез | Непатогенен |
| <i>M. tuberculosis</i> | То же | Локальное поражение органов | То же |
| <i>M. avium</i> | Непатогенен | Сепсис | Генерализованный туберкулез |

Серологическая диагностика: постановку РСК рекомендуют как дополнительный метод при отборе для диагностического уоя животных, положительно реагирующих на туберкулин.

Аллергическая диагностика. Не принадлежит к лабораторным методам, но на практике имеет ведущее значение для прижизненного определения инфекции у животных, в том числе у птиц.

Применяют сухой очищенный туберкулин (протеин—пурифид—дериват: ПИД), который вводят крупному рогатому скоту, буйволам, верблюдам, оленям в толщу кожи в области средней трети шеи, свиньям — на наружную поверхность основания уха, курам — в толщу кожи бородки. Реакцию учитывают через 72 ч, измеряя толщину кожной складки с учетом припухлости. Положительной реакцией считают тестоватый отек кожи размерами 35×45 мм и более, который на ощупь теплее окружающих тканей. Кожная складка увеличивается на 3 мм и более. Для измерения кожной складки используют кутиметр. У кур реакцию учитывают через 30...36 ч: при положительной реакции бородка опускает, становится горячей и отвисает.

Биопрепараты. Вакцина БЦЖ (BCG) представляет собой живую лиофильно высушенную культуру вакцинного штамма туберкулезных микобактерий бычьего типа. Вакцинный штамм BCG (*Bacillus Calmette — Guerin*) был получен в 1924 г. французскими учеными Кальметтом и Гереном путем длительного культивирования (в течение 18 лет) вирулентного штамма *M. bovis* на

картофельно-глицериновой среде с добавлением бычьей желчи. Для приготовления противотуберкулезной вакцины штамм БЦЖ выращивают на специальных средах в течение 20 дней. Приготовленную вакцину высушивают методом лиофилизации и применяют для профилактики туберкулеза у людей (прививают всех новорожденных). В ветеринарной практике вакцину БЦЖ используют в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах для профилактики туберкулеза у крупного рогатого скота.

Сухой очищенный туберкулин ППД для млекопитающих готовят из культуры микобактерий, которую выращивают в течение двух месяцев, а затем стерилизуют автоклавированием. Белок из культуральной жидкости осаждают трихлоруксусной кислотой. Преципитат белка, отделенный центрифугированием, растворяют в воде и вновь осаждают сульфатом аммония. Белок — это основная фракция туберкулина ППД, содержание белка составляет 73,4...90 %. Кроме того, в состав препарата входят полисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты.

Альтернативный (АТК) для млекопитающих — это стерильный фильтрат культуры микобактерий, выращенных в течение двух месяцев на мясо-гидролизатном картофельно-глицериновом бульоне. Бульон концентрируют, выпаривая до 1/10 первоначального объема, и затем добавляют 20 % экстракта бактериальной массы микобактерий.

ППД-туберкулин для птиц готовят, используя пять штаммов *M. avium*. Выделение белка из культуральной жидкости и приготовление препарата проводят, как при получении АТК.

Сухой очищенный комплексный аллерген из атипичных микобактерий (КАМ) готовят во ВГНКИ по типу ППД-туберкулина. Симультанную пробу КАМ используют в качестве дополнительного метода диагностики в благополучных по туберкулезу хозяйствах. Туберкулины контролируют на стерильность, безвредность, специфичность и активность.

Паратуберкулез (паратуберкулезный энтерит). Хроническая болезнь крупного рогатого скота, реже овец. Характеризуется нарушением деятельности желудочно-кишечного тракта, приводящим к истощению и гибели животного.

Возбудитель паратуберкулеза — *M. paratuberculosis*, род *Mycobacterium*, семейство *Mycobacteriaceae*.

Лабораторная диагностика паратуберкулеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии (микроскопия — это основной метод), выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим признакам.

Материал для исследования. От павших или убитых с диагнос-

тической целью животных берут пораженные участки подвздошной кишки — утолщенные, с выраженной складчатостью слизистой оболочки и брыжеечные лимфоузлы. От живых животных в лабораторию направляют фекалии с примесью слизи и крови и соскобы со слизистой оболочки прямой кишки.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В мазках, окрашенных по методу Циля—Нильсена, возбудители паратуберкулеза темно-красного цвета, палочковидной формы, размером $(0,6...2) \times (0,2...0,5)$ мкм. Для старых культур характерен полиморфизм: палочки могут быть расширенными или в виде глыбок, кокков. В мазках из патологического материала клетки располагаются кучками в виде «палисада» (частокола). Возбудитель неподвижен, не образует спор и капсул, кислотоустойчив.

Кроме световой применяют также люминесцентную микроскопию мазков-отпечатков из патологического материала, окрашенных флуорохромами, как при туберкулезе.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Культивирование и выделение чистой культуры возбудителя сопряжены с большими трудностями. В питательные среды добавляют (до 1...4 %) ростовой фактор микобактин — спиртовой экстракт из микобактерий флей (тимофеевой травы) или же экстракт из микобактерий других видов. По типу дыхания возбудитель — аэроб, температурный оптимум 38 °С.

В жидких питательных средах образует нежную беловатую пленку, которая через 3...4 мес опускается на дно пробирки. На плотных питательных средах через 1,5...2 мес вырастают сухие сморщенные беловато-серые или желтоватые колонии.

Биопроба. При паратуберкулезе этот метод не применяют, так как лабораторные животные к возбудителю невосприимчивы.

Серологическая диагностика основана на исследовании в РСК: реакцию ставят с пробами сывороток крови от больных животных по общепринятой методике.

Аллергическая диагностика. Метод, применяемый в хозяйствах. Для аллергической диагностики паратуберкулеза у крупного рогатого скота используют альптуберкулин для птиц, стандартный сухой очищенный туберкулин ППД для птиц и паратуберкулин, у овец — сухой очищенный туберкулин ППД для птиц.

Актиномикоз. Хроническая бактериальная инфекция; характеризуется образованием в различных тканях плотных, четко ограниченных припухлостей — актиномиком, подверженных некротическому распаду (рис. 81). Восприимчивы различные виды животных и человек. Возбудитель — бактерия из группы актиномицет — *Actinomyces bovis*. У человека актиномикоз вызывает *A. israeli*.

Лабораторная диагностика актиномикоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование вклю-



Рис. 81. Актиномикозное поражение нижней челюсти с множеством свищевых ходов у коровы

чает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пораженные лимфатические узлы, стерильно взятый гной из абсцессов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Для приготовления препаратов в материале находят твердые серовато-белые зернышки с зеленоватым оттенком — друзы, которые представляют собой скопление клеток возбудителя. Их промывают в дистиллированной воде и переносят на предметное стекло в каплю 10...20%-го раствора гидроксида натрия или калия, выдерживают 15 мин или слегка подогревают над пламенем горелки. Окрашивают по Граму. Затем наносят каплю 50%-го водного раствора глицерина, накрывают препарат покровным стеклом и исследуют под малым увеличением микроскопа или с помощью иммерсионной системы. При микроскопировании заметен гомогенный центр друзы, состоящий из густо переплетенных нитевидных палочек, булавовидно утолщающихся к периферии (рис. 82). Центр друзы окрашен грамположительно, а периферическая часть — грамотрицательно. Такая микроскопическая кар-

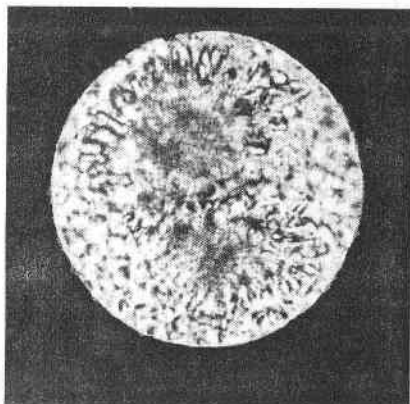


Рис. 82. Друзы из актиномикомы коровы: по периферии друзы колбовидные вздутия клеток

тина характерна и имеет диагностическое значение. Друзы в экссудате могут быть не всегда, несмотря на наличие отдельных клеток.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37...38 °С. Материал высевают на МПА, содержащий 1 % глюкозы, ПЖА с 1 % глюкозы, кровяной или сывороточный агар.

Макроскопически видимые колонии появляются через 7...14, иногда 15...30 дней культивирования. Колонии на МПА с глюкозой первоначально белые, мягкой консистенции, с ровными краями, иногда с кли-

новидными выступами по периферии. Со временем колонии приобретают светло-коричневую окраску. При выращивании в анаэробных условиях формируются гладкие, выпуклые, непрозрачные, влажные колонии, на кровяном МПА вокруг колоний образуется слабая зона гемолиза. В мазках из культур, выращенных в аэробных условиях, обнаруживают нити и цепочки из грамположительных палочек, в анаэробных — короткие палочки.

У выделенных культур изучают ферментативную активность: возбудитель разжижает желатину, ферментирует с образованием кислоты глюкозу, левулезу, галактозу, глицерин.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить мазки из смеси бактерий, окрасить по методу Циля—Нильсена, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать характер роста микобактерий на питательных средах.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Какова таксономическая характеристика возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза?
2. Каковы морфологические и тинкториальные особенности возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза?
3. В чем состоят культуральные особенности возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза?
4. По каким свойствам дифференцируют возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза?
5. В чем заключается лабораторная диагностика актиномикоза?

Тема 25

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителя, схемой лабораторной диагностики сибирской язвы, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культура вакцинного штамма *B. anthracis* на МПА, в МПБ, мазки с феноменом «ожерелья», сибиреязвенная преципитирующая сыворотка, стандартный антиген, пробирки Уленгута, штативы, пипетки Пастера, сибиреязвенные биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Сибирская язва. Острое инфекционное заболевание сельскохозяйственных животных многих видов, а также человека; характеризуется признаками септицемии или образованием карбункулов, у свиней часто протекает с поражением заглочных лимфатических узлов.

Возбудитель сибирской язвы — бактерия *Bacillus anthracis*, род *Bacillus*.

Лабораторная диагностика сибирской язвы основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале (методом световой и люминесцентной микроскопии, а также биопробой), выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим признакам. При нечетких результатах применяют и другие методы.

Материал для исследования. В лабораторию направляют ухо от трупа животного, перевязанное у основания (ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп), или кровь из надреза уха в виде толстого мазка на двух предметных стеклах (чтобы исключить попадание возбудителя во внешнюю среду, место разреза прижигают шпателем); от трупов свиней — заглочные лимфатические узлы и участки отечной соединительной ткани. Если подозрение на сибирскую язву возникло в ходе вскрытия, его прекращают и на исследование направляют часть селезенки.

Нативный материал помещают в чистую посуду (пробирки, банки). Высушенные мазки кладут в чашки Петри, которые оборачивают плотной бумагой. На упаковке делают надпись «Мазок не фиксирован!» Посуду с материалом помещают во влагонепроницаемую тару, обвязывают, пломбируют или опечатывают, делают надпись «Верх. Осторожно!» и с сопроводительными документами нарочным направляют в лабораторию.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой грамположительные прямые палочковидные бактерии размером $(1...1,5) \times (6...10)$ мкм, без жгутиков, образует споры и капсулу.

Из поступившего в лабораторию материала готовят мазки, окрашивают по Граму; одним из методов для выявления капсулы (методы Михина, Гимзы, Ольта и т. д.), а также сибиреязвенными люминесцирующими сыворотками. В окрашенных мазках из трупного материала возбудитель обнаруживают в виде крупных грамположительных палочковидных бактерий, располагающихся одиночно, парами, короткими цепочками. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы закруглены, клетки окружены капсулой. В отдельных случаях, особенно в мазках из материала, полученного от свиней, форма клеток может быть нетипичной: короткие, толстые, изогнутые или зернистые палочки со вздутием в центре или на концевых частях бактерий.

Предварительный ответ в хозяйство, откуда поступил материал, дают немедленно по результатам микроскопического исследования.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Факультативный анаэроб, температурный оптимум $35...37^\circ\text{C}$, рН $7,2...7,4$. С целью выделения культуры возбудителя исследуемый материал засевают в МПБ, на МПА или в бульон и агар Хоттингера и инкубируют в аэробных условиях $18...24$ ч, а при отсутствии роста — до 48 ч.

На МПА *M. anthracis* формирует плоские, матово-серые, шероховатые, с отростками на краях колонии (R-форма), может образовывать и атипичные колонии без отростков. Край колоний R-формы под малым увеличением микроскопа имеют вид локонов, получивших название «львиная грива» (рис. 83). В МПБ рост возбудителя характеризуется образованием на дне пробирки рыхлого осадка при прозрачной питательной среде; после встряхивания осадок разбивается на хлопья. Если возбу-



Рис. 83. Колонии *B. anthracis* на агаре под малым увеличением. Образование локонов



Рис. 84. *B. anthracis*. Образование нитей в культуре ($\times 400$)

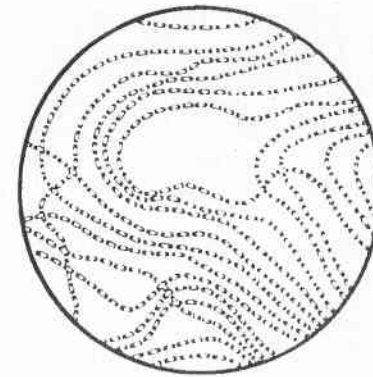


Рис. 85. *B. anthracis*. Образование спор ($\times 1200$)

дитель выращивать на питательных средах, содержащих сыворотку крови, и в атмосфере с повышенным содержанием оксида углерода (IV), то на МПА образуются гладкие колонии S-формы, а в МПБ отмечают рост в виде диффузного помутнения среды.

В выросших культурах исследуют морфологические и тинкториальные свойства клеток. В мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают длинные цепочки из грамположительных типичных палочек; в мазках из культур на средах с диффузным ростом находят отдельные или парные палочки (рис. 84...86). На бессывороточных средах возбудитель формирует капсулу, причем клетки в препарате в последнем случае чаще располагаются одиночно или парами.

При значительной контаминации материала посторонней микрофлорой (сырье животного происхождения, объекты внешней среды) посев делают на селективный агар следующего состава: расплавленный МПА — 100 мл, сульфат полимиксина М — 0,5 мл, невигапон — 0,5 мл, гризеофульвин — 1 мл, моющее средство «Прогресс» — 10 мл, фенолфталеинфосфат натрия — 0,1 мл; перемешивают, разлива-

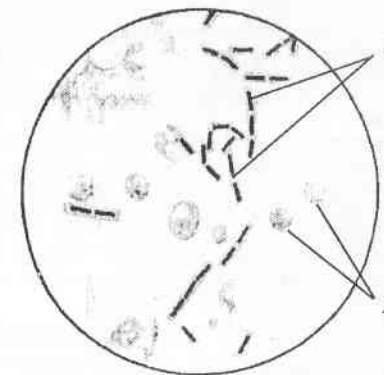


Рис. 86. Клетки *B. anthracis* в крови животного:

1 — клетки возбудителя с капсулой; 2 — форменные элементы крови

ют по чашкам Петри. Через 18...24 ч культивирования на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри наносят 1...2 мл 25%-го водного раствора аммиака, чашку переворачивают. Колонии *B. anthracis* остаются бесцветными, колонии бактерий с фосфатазной активностью розовеют.

Биопроба. Заражение лабораторных животных исходным материалом — обязательный этап, проводимый сразу после поступления материала в лабораторию. Тканевой суспензией заражают подкожно двух белых мышей по 0,2...0,5 мл или морских свинок по 0,5...2 мл. Наблюдение ведут в течение 10 сут. При наличии возбудителя животные погибают обычно через 1...3 сут. Павших животных исследуют с выделением культуры возбудителя.

Если в ходе указанных исследований выделена бактерия, типичная для *B. anthracis* по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам, патогенная для лабораторных животных, то дальнейшие исследования не проводят и диагноз считают установленным.

В случае получения нечетких результатов при вышеизложенных исследованиях проводят дополнительные с целью дифференциации выделенной культуры от сходных сапрофитных бактерий, и в первую очередь от *B. cereus*. При этом определяют способность микроорганизма к капсулообразованию путем посева на сывороточные среды, патогенность для лабораторных животных в биопробе, чувствительность к пенициллину, сибиреязвенному бактериофагу, специфичность к сибиреязвенным люминесцирующим сывороткам, гемолитическую активность, наличие жгутиков (табл. 22).

22. Дифференциация *B. anthracis* от сапрофитных бактерий

| Дифференцирующий признак | Виды бактерий рода <i>Bacillus</i> | | | | |
|---|------------------------------------|------------------|--|--|---|
| | <i>B. anthracis</i> | <i>B. cereus</i> | <i>B. megaterium</i> (капустная бацилла) | <i>B. mycoides</i> (корневидная бацилла) | <i>B. subtilis</i> (сенная бацилла) |
| Подвижность | — | + | + | + | + |
| Капсулообразование | + | — | — | — | — |
| Гемолиз (на кровяном агаре) | — | + | — | + | ± |
| Чувствительность к пенициллину (феномен «ожерелья») | + | — | — | — | — |
| Чувствительность к сибиреязвенному фагу | + | — | — | — | — |
| Реакция с люминесцирующей сывороткой (сибиреязвенной) | + | — | — | — | — |
| Патогенность для белых мышей или морских свинок | + | ± | — | — | — |

Тест «жемчужного ожерелья» разработан для определения чувствительности выделенного микроорганизма к пенициллину. В две колбочки (пробирки) с расплавленным МПА (температура 45...50 °С) добавляют пенициллин из расчета 0,05...0,5 ЕД/мл и переносят в две чашки Петри, в третью чашку наливают обычный МПА. После застывания агара из него вырезают пластинки размером 1,5 см², которые переносят на предметные стекла и помещают в чашки Петри. На каждую пластинку бактериологической петлей наносят исследуемую 3-часовую бульонную культуру. Чашки выдерживают 1...3 ч в термостате. Затем посеы просматривают под микроскопом с объективом × 40 и иммерсионной системой. Перед просмотром зону роста накрывают покровным стеклом. Сибиреязвенные микробы на МПА с пенициллином приобретают шаровидную форму, а цепочки — вид «жемчужного ожерелья». Спорообразующие сапрофитные аэробы в аналогичных условиях растут в обычной форме. На агаре без пенициллина сибиреязвенные микробы образуют длинные цепочки из типичных палочек.

Для определения чувствительности к сибиреязвенному бактериофагу культуру или материал засевают на скошенный МПА, затем на поверхность среды наносят каплю бактериофага в рабочем титре и посеы выдерживают при температуре 37...38 °С 24 ч. В случае принадлежности культуры к *B. anthracis* на поверхности МПА в зоне нанесения бактериофага остается стерильная зона при наличии роста микроорганизма на остальных участках среды.

Для идентификации *B. anthracis* методом люминесцирующих антител используют флуоресцирующую адсорбированную сыворотку, не дающую перекрестных реакций с антигенно-родственными сапрофитными бактериями.

Гемолитическую активность исследуемой культуры определяют посевом на 5%-й МПА или в МПБ.

Наличие жгутиков исследуют посевом в 0,3%-й МПА или методом «раздавленной капли».

Если для исследования поступил загнивший материал, который нельзя подвергать обычному бактериологическому исследованию, то диагноз ставят на основании обнаружения антигенов возбудителя в материале при помощи реакции кольцевой преципитации.

Материал экстрагируют физиологическим раствором (соотношение 1:10) путем кипячения в течение 30...40 мин (горячий способ). Экстракцию смеси тканевой суспензии и карбонизированного физиологического раствора (соотношение 1:10) можно проводить в течение 16...18 ч при комнатной температуре (холодный способ). Экстракт фильтруют через асбестовую вату и исследуют в РП.

Реакцию ставят методом «наслаивания» или «подслаивания». При «наслаивании» в преципитационную пробирку вносят

0,2...0,3 мл преципитирующей сыворотки и осторожно наливают (наслаивают) исследуемый экстракт таким образом, чтобы компоненты не перемешивались. При «подслаивании» в пробирку вначале вносят 0,2...0,3 мл экстракта, затем под него пастеровской пипеткой — равное количество сибирезывенной преципитирующей сыворотки. Одновременно ставят контроли (см. далее). Реакцию считают положительной, если через 1...2 мин и не позже чем через 15 мин на границе между компонентами появился тонкий беловатый диск преципитации.

В ветеринарных лабораториях часто исследуют на сибирскую язву в РП коженно-меховое сырье. В лабораторию доставляют пробы коженного сырья в виде небольших квадратиков (или кружков), взятых от шкур в местах, вырез которых не снижает товарной ценности. Эти пробы нанизывают на тонкую проволоку в том порядке, в котором шкуры расположены на складе. Поступившие пробы обязательно стерилизуют автоклавированием при 1,5 атм 30 мин. Затем пробы измельчают и берут навески: 1 г — от парного, мороженого, пресно-сухого и сухосоленого сырья и 2 г — от мокросоленого. Пробы заливают экстрагирующей жидкостью (физиологический раствор, содержащий 0,3 % кристаллического фенола).

Пробы сырья от всех видов животных экстрагируют холодным способом при комнатной температуре в течение 16...20 ч; пробы от свиных шкур кипятят 30 мин. Экстракты фильтруют через асбестовую вату до прозрачности (предварительно взболтав содержимое баночек с пробами). Компоненты соединяют методом «наслаивания» или «подслаивания».

Контроли РП. 1. Контроль преципитирующей сыворотки: а) со стандартным сибирезывенным антигеном (результат положительный в течение 1...2 мин); б) с экстрактом из заведомо благополучных боенских кож (результат отрицательный в течение 1 ч); в) с экстрагирующей жидкостью (результат отрицательный в течение 1 ч). 2. Контроль асбестовой ваты на нейтральность (при поступлении каждой новой партии асбестовой ваты).

Учет результатов РП проводят через 10...15 мин для пресно-сухого (одиночные пробы), через 30 мин — для пресно-сухого (сдвоенные пробы) и сухосоленого (одиночные пробы), через 60 мин — для сухосоленого (сдвоенные пробы) и мокросоленого сырья.

При исследовании на сибирскую язву свежего тканевого материала, а также при идентификации выделенных культур можно использовать реакцию диск-преципитации, которая основана на взаимодействии продуктов метаболизма возбудителя (антиген), растущего в жидкой питательной среде, с антителами преципитирующей сибирезывенной сыворотки.

В стерильную бактериологическую пробирку вносят 0,5...1 мл преципитирующей сибирезывенной сыворотки, на ее поверх-

ность осторожно (по стенке пробирки) наслаивают расплавленный (45...50 °С) 1%-й агаровый гель столбиком высотой 5...7 мм. Далее на поверхность застывшего агара наливают 1...1,5 мл жидкой питательной среды (МПБ, среда ГКИ и т. д.) и в нее делают посев исследуемого тканевого материала или идентифицируемой культуры микроорганизма.

Посевы выдерживают при 37...38 °С 16...20 ч. Результаты учитывают, просматривая пробирку в проходящем свете на черном фоне. В положительном случае в средней части столбика агарового геля обнаруживают тонкую белую четкую линию (диск) преципитации. Сапрофитные бактерии при росте в этой системе преципитации не дают. Некоторые штаммы *B. cereus* могут вызывать в нижней части агарового столбика образование рыхлой толстой зоны преципитации, которая за 30...40 ч разрыхляется и сливается с преципитирующей сывороткой.

Биопрепараты. Вакцина СТИ — живая вакцина из эталонного штамма, полученного Н. Н. Гинсбургем (1944), представляет собой спорую (95...100 %) агаровую культуру в виде суспензии в 30%-м стерильном растворе глицерина; содержит $(2,5...3,5) \cdot 10^7$ жизнеспособных спор в 1 мл. Вакцину контролируют на чистоту роста, концентрацию спор, безвредность на кроликах, иммуногенность на морских свинках.

Вакцина ГНКИ — сухая живая вакцина из эталонного штамма ГНКИ. Содержит $5 \cdot 10^7$ спор в 1 мл. Готовят и контролируют так же, как вакцину СТИ. Срок годности сухой вакцины 3 года.

Вакцина против сибирской язвы из штамма № 55. Ассоциированная живая жидкая вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота.

Лечебно-профилактическую сибирезывенную сыворотку получают гипериммунизацией лошадей инактивированной сибирезывенной культурой. Сыворотку проверяют на стерильность, безвредность на белых мышах и морских свинках, активность на кроликах. Также выпускают противосибирезывенный глобулин.

Сибирезывенная преципитирующая сыворотка предназначена для исследования материала на сибирскую язву в реакции преципитации. Сыворотку получают гипериммунизацией лошадей.

Сибирезывенный стандартный антиген для РП выпускают для контроля активности преципитирующей сыворотки. Представляет собой экстракт из инактивированной бактериальной массы *B. anthracis*.

Сибирезывенные люминесцирующие сыворотки готовят из сибирезывенной преципитирующей сыворотки; предназначены для ускоренного обнаружения некапсулированных клеток возбудителя в первичных посевах.

Сибирезывенные диагностические бактериофаги представля-

ют собой освобожденную от бактерий путем фильтрования жидкость бульонной культуры возбудителя, зараженную бактериофагом. Титр бактериофага 10.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить и описать морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B. anthracis*.

2. Освоить технику постановки РП для исследования тканевого и кожевенно-мехового сырья на сибирскую язву.

3. Ознакомиться с феноменом «ожерелья» и сибиреязвенными биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Каковы правила взятия патологического материала?
2. Какие методы применяют для бактериологической диагностики сибирской язвы?
3. Каковы морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B. anthracis*?
4. На чем основана дифференциация *B. anthracis* от сапрофитных спорообразующих аэробов?
5. Как идентифицируют возбудитель сибирской язвы при помощи сибиреязвенного бактериофага?
6. Что такое феномен «ожерелья»?
7. Какие серологические методы применяют для обнаружения сибиреязвенного антигена в исследуемом материале?

Тема 26

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ОТЕКА, АНАЭРОБНОЙ ДИЗЕНТЕРИИ ЯГНЯТ, БРАДЗОТА, ИНФЕКЦИОННОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ, ЭМФИЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей, схемами лабораторного исследования, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культуры *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum* на среде Китта—Тароцци, глюкозо-кровяном агаре, среде Вильсона—Блера, трупы морских свинок, павших после заражения перечисленными анаэробами, наборы инструментов в стерилизаторах для вскрытия трупов морских свинок, пастеровские пипетки, стерильная среда Китта—Тароцци в пробирках, анаэроустаты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Злокачественный отек. Это неконтагиозное инфекционное заболевание животных всех видов, возникающее после ранений, травм, родов, кастраций. Характеризуется быстро увеличиваю-

щимися, крепящими отеками, болезненными отеками, распадом тканей и сепсисом.

У злокачественного отека полимикробная этиология. Основные возбудители: *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi (oedematiens)*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*, а иногда *C. chauvoei*. Каждый из них может самостоятельно вызвать заболевание, но чаще их выделяют в ассоциации друг с другом или другими анаэробными и аэробными микроорганизмами (стафилококки, стрептококки и др.). Из сопутствующих микроорганизмов важную роль играет *C. sporogenes*, придающий процессу гнилостный характер и существенно отягощающий течение болезни. Возбудителей злокачественного отека относят к роду *Clostridium*.

Лабораторная диагностика злокачественного отека основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, тканевый экссудат и паренхиматозные органы, а при поражении половых органов — истечения из влагалища и кусочки органов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму. При микроскопировании отмечают форму микробных клеток, их взаимное расположение, тинкториальные свойства, образование спор и капсул, ориентируясь на характеристики возбудителей, изложенные в таблице 23 (рис. 87...91).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудители — облигатные анаэробы, температурный оптимум 37...38 °С. Исследуемый материал высевает на среды Китта—Тароцци, Вильсона—Блера, культивируют 24...48 ч. Посевы на средах в чашках Петри инкуби-

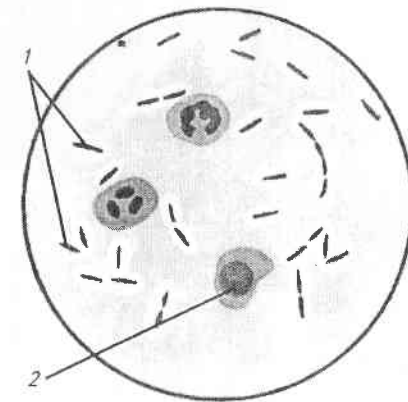


Рис. 87. *C. perfringens* в отечной жидкости:

1 — клетки возбудителя с капсулой; 2 — форменные элементы

23. Культурально-морфологические свойства возбудителей кластридиозов

| Название возбудителя | Окраска по Граму | Морфология микробов | Форма спор и их расположение | Оптimum разрежения воздуха, мм рт. ст. | Характеристика роста на среде Китта — Гароцци | Характеристика колонии на глюкозо-кровяном агаре Цейслера |
|----------------------------------|------------------|---|---|--|---|--|
| 1. <i>C. chauvoei</i> | + | Неравномерно окрашенные изолированные палочки, иногда расположены цепочкой по три-четыре клетки | От продолговатой до круглой, расположены терминально или лежат свободно | 5...10 | Равномерное слабое помутнение и газообразование, через 24 ч бульон просветляется | Круглые, плоские, приподнятые с ровными краями, напоминающие перламутровую пуговицу или винтоградный лист; окружены узкой зоной прозрачного гемолиза |
| 2. <i>C. septicum</i> | + | Изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек обнаруживаются в виде нитей | Овальные, расположены субтерминально или центрально | 8...15 | Интенсивное помутнение, обильное газообразование | Нежный, бесцветный, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками; колонии окружены зоной гемолиза |
| 3. <i>C. perfringens</i> | + | Толстые неподвижные палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно; образуют капсулу | Овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупа и молодых культур спор не обнаруживаются | 40 | Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование | Округлые, гладкие, выпуклые, серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета с двумя зонами. Среда буро-коричневого цвета |
| 4. <i>C. novyi (oedematiens)</i> | + | Крупные полиморфные палочки с закругленными или обрубленными концами, расположены одиночно, редко попарно или цепочками из 3...4 клеток | Овальные, расположены субтерминально или центрально | 3...5 | Рост более интенсивный внизу, через 18...24 ч бульон просветляется, на дне выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое | Шероховатые, корневидные, складчатые, с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать |
| 5. <i>C. sordellii</i> | + | Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2...4 клетки | Овальные, расположены субтерминально или центрально | 8...15 | Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур — слизистый осадок | Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный, но может отсутствовать |
| 6. <i>C. histolyticum</i> | + | Стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, попарно, редко цепочками | Овальные, расположены субтерминально («игольное ушко») | 8...15 | Интенсивное помутнение без газообразования | Мелкие, круглые, гладкие колонии с ровными краями, гемолиз отсутствует, иногда незначительный |

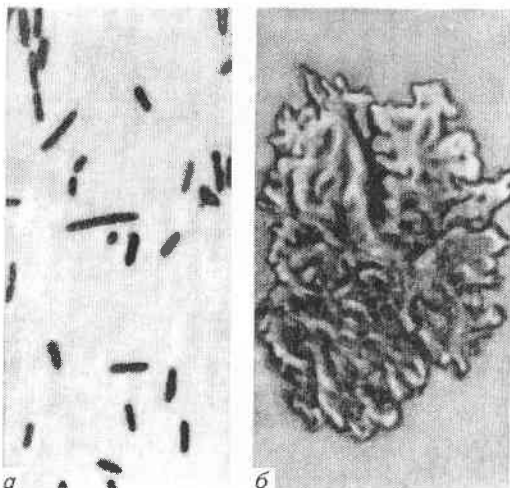


Рис. 88. *C. oedematiens* (*C. novyi*):

a — чистая культура; *б* — колония

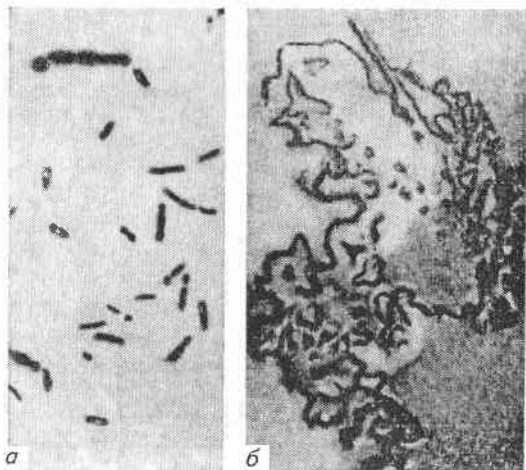


Рис. 89. *C. septicum*:

a — чистая культура; *б* — колония

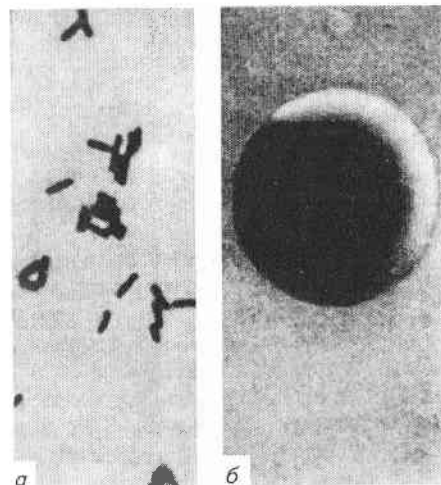


Рис. 90. *C. perfringens*:

a — чистая культура; *б* — колония

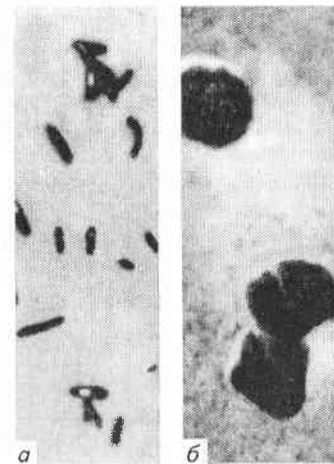


Рис. 91. *C. histolyticum*:

a — чистая культура; *б* — колония

руют в анаэроостате (крышкой вверх). В первичных посевах обычно вырастают смешанные культуры, поэтому, чтобы получить чистые культуры, из первичных посевов делают дробный рассев на глюкозо-кровяной агар Цейссlera в чашках Петри.

У выделенных культур изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, принимая во внимание данные по свойствам возбудителей, указанные в таблицах 23, 24. При необходимости определяют токсигенные свойства возбудителей и тип токсина в реакции нейтрализации (см. тему 19).

По антигенному составу токсических факторов различают 6 сероваров *C. perfringens* — А, В, С, D, Е, F.

C. perfringens серовар А вызывает злокачественный отек у людей и животных, пищевую токсикоинфекцию у лошадей, энтеротоксемию у телят и свиней, некротический мастит у рогатого скота. *C. perfringens* серовар В — возбудитель анаэробной дизентерии у ягнят, телят, поросят, козлят, жеребят. *C. perfringens* серовар С вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец, телят, поросят, ягнят, коз, верблюдов. *C. perfringens* серовар D — возбудитель энтеротоксемии у овец, коз, телят, кроликов. *C. perfringens* серовар Е выделяют при энтеротоксемии у телят и ягнят. *C. perfringens* серовар F вызывает некротический энтерит людей.

По составу растворимых антигенов токсина различают четыре серовара *C. novyi* — А, В, С и D.

24. Ферментативные свойства патогенных кластридий

| Вид микроорганизмов | Питательная среда | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|-------------|---------------------|---------|----------|--------|----------|---------|----------|-----------|
| | Желатина | Сероводород | Молоко | Глюкоза | Сахароза | Маннит | Глицерин | Салицин | Мальтоза | Галактоза |
| <i>C. perfringens</i> | Разжижает на 3...5 сут | Не выделяет | Быстро свертывает | + | + | - | +/- | - | + | + |
| <i>C. novyi (oedematiens)</i> | Разжижает на 2...4 сут | Непостоянно | Свертывает | + | - | - | - | - | +/- | - |
| <i>C. septicum</i> | Разжижает на 2...4 сут | Непостоянно | Свертывает | + | - | - | - | + | + | - |
| <i>C. chauvoei</i> | Разжижает на 2...6 сут | Не выделяет | Медленно свертывает | + | + | - | - | - | + | + |
| <i>C. histolyticum</i> | Разжижает | Непостоянно | Пептонизация | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>C. sordellii</i> | Разжижает | Непостоянно | Свертывает | + | - | - | - | - | + | - |
| <i>C. sporogenes</i> | Разжижает | Выделяет | Пептонизация | - | - | - | - | - | - | - |

Пр и м е ч а н и е. «+» — полная ферментация; «+/-» — непостоянная или частичная ферментация; «-» — ферментация отсутствует.

C. novyi серовар А выделяют при злокачественном отеке животных и человека и при браздоте. *C. novyi* серовар В — возбудитель некротического гепатита овец, крупного рогатого скота и свиней, газовой гангрены у людей. *C. novyi* серовар С вызывает хронический остеомиелит у буйволов. *C. novyi* серовар D — возбудитель инфекционной иктерогемоглобинурии у крупного рогатого скота, овец и свиней.

Биопроба. Одновременно с посевом патологического материала на питательные среды заражают морских свинок. Патологический материал измельчают, тщательно растирают в стерильной ступке, добавляют небольшое количество МПБ. Полученную смесь вводят подкожно в область брюшных мышц двум морским свинкам массой 350...400 г по 0,5...1 мл. При наличии в исследуемом материале возбудителя злокачественного отека морские свинки погибают через 16...48 ч в зависимости от вида возбудителя. При вскрытии у павших животных обнаруживают патологоанатомические изменения, характерные для того или иного вида возбудителя (табл. 25).

25. Патогенные свойства возбудителя злокачественного отека

| Название возбудителя | Восприимчивые лабораторные животные | Сроки гибели морских свинок, ч | Патологоанатомическая картина у морских свинок, зараженных возбудителями злокачественного отека |
|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| <i>C. septicum</i> | Морские свинки, кролики, белые мыши | 14...28 | Кожа легко отделяется от мышц. Мышцы и подкожная клетчатка светло-красного или розового цвета, в подкожной клетчатке большое количество пузырьков газа. Кишечник вздут, наполнен разжиженными массами, содержащими пузырьки газа, сосуды инъецированы. В грудной полости и сердечной сорочке обнаруживают значительное количество трансудата |
| <i>C. novyi (oedematiens)</i> | То же | 12...36 | На месте инъекции наблюдают желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные |
| <i>C. perfringens</i> А и D | » | 36...48 | Кожа на месте инъекции часто отслаивается от мускулатуры, образуя мешок. Мышцы имеют вид вареного мяса, серовато-грязного цвета (более выражено при заражении типом А). Кишечник вздут, сосуды инъецированы |
| <i>C. perfringens</i> В и С | » | 36...48 | Кожа на месте инъекции легко отделяется, но не отслаивается. Мускулатура сухая, красного цвета различных оттенков. Кишечник вздут, геморрагически воспален, иногда образует язвы (тип В) |

| Название возбудителя | Восприимчивые лабораторные животные | Сроки гибели морских свинок, ч | Патологоанатомическая картина у морских свинок, зараженных возбудителями злокачественного отека |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| <i>C. histolyticum</i> | Морские свинки, кролики, белые мыши | 18...48 | При подкожном заражении большей частью наблюдают выздоровление морских свинок. При заражении в мышцу бедра кожа красно-фиолетовая, напряжена, иногда лопается. Мышцы теряют свою структуру, расплавляются и превращаются в кашицеобразную массу с примесью сгустков крови. Мягкие ткани отделяются от костей и сосудов. Газ не образуется, гнилостного распада нет |

Из ткани в месте введения патологического материала, а также из крови сердца, печени готовят мазки-отпечатки и делают посеы на среду Китта—Тароцци, МПА и в МПБ.

Для проверки вирулентности выделенных культур суточную культуру, выращенную на среде Китта—Тароцци, вводят подкожно в область брюшных мышц двум морским свинкам в дозе 0,5...1 мл. Наблюдение за подопытными животными ведут в течение 8 сут.

Брадзот овец. Острая токсикоинфекция овец. Характеризуется геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга и двенадцатиперстной кишки, а также дегенеративными изменениями паренхиматозных органов.

Возбудители брадзота — *C. septicum* и *C. novyi (oedematiens)*.

Лабораторную диагностику проводят, как при злокачественном отеке. Материалом для исследования при подозрении на брадзот служат измененные участки сычуга и инфильтрат подкожной клетчатки.

Токсичность *C. novyi (oedematiens)* определяют на двух белых мышах, которым внутривенно или внутрибрюшинно вводят инфильтрат двухсуточных исследуемых культур. При наличии токсина мыши погибают через 24...72 ч.

Анаэробная дизентерия ягнят. Острая токсикоинфекция, поражающая ягнят в первые пять дней жизни. Характеризуется геморрагической энтеротоксемией и сопровождается высокой смертностью.

Возбудитель болезни — *C. perfringens* В.

Материалом для исследования служат свежий труп ягненка или перевязанный с обеих сторон отрезок пораженного кишечника с содержимым, кусочки паренхиматозных органов, брыжечные лимфоузлы, трубчатая кость.

Содержимое желудка и кишечника направляют в лабораторию после консервирования хлороформом (одна капля на 10 мл пато-

логического материала) или стерильным 30...40%-м раствором глицерина.

Отобранные пробы должны быть доставлены в лабораторию в течение четырех часов с момента гибели животного, а консервированные — в течение 1...2 сут.

Диагноз ставят при выделении чистой культуры возбудителя и обнаружении токсина в содержимом тонкого кишечника.

Выделение чистой культуры *C. perfringens* проводят, как при злокачественном отеке. Токсин и его тип определяют методами, изложенными в разделе «Анаэробная энтеротоксемия» и в теме 19.

Анаэробная энтеротоксемия. Острая инфекционная болезнь преимущественно молодняка, характеризующаяся геморрагическим гастроэнтероколитом, признаками токсемии, некрозом ворсинок тонкого отдела кишечника.

Возбудитель энтеротоксемии овец, коз, кроликов — *C. perfringens* тип D, телят — *C. perfringens* типы С, D, E, поросят — *C. perfringens* типы В, С.

Лабораторная диагностика анаэробной энтеротоксемии состоит из двух этапов: 1) обнаружения токсина возбудителя в содержимом кишечника; 2) выделения чистой культуры и идентификации возбудителя по культурально-морфологическим, патогенным и токсигенным свойствам.

Материалом для исследования служат содержимое пораженного отдела кишечника и кусочки паренхиматозных органов.

Для обнаружения токсина содержимое кишечника разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 1 (1 : 2), экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, центрифугируют при 3000...5000 мин⁻¹ 20 мин. Надосадочную жидкость вводят внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам по 0,5 мл или внутривенно кролику 1...1,5 мл. При наличии в исследуемом материале токсина животные погибают в течение 12 ч. В случае гибели в более поздние сроки (до 24 ч) проводят бактериологическое исследование, чтобы исключить какую-либо другую инфекцию.

При обнаружении токсина в содержимом кишечника приступают к определению типа токсина в реакции нейтрализации (см. тему 19). Реакцию ставят на белых мышах, морских свинках или кроликах. При постановке реакции на мышах результаты оценивают по гибели или выживанию животных, которым ввели смесь сывороток и токсина. При использовании морских свинок и кроликов результат учитывают по наличию или отсутствию некроза на месте внутрикожного введения смеси: у животных удаляют шерсть на боку и на следующий день в этот участок вводят смесь сыворотки и токсина.

Второй этап исследования — бактериологический метод выделения возбудителя — проводят по общепринятой методике. По-

лученную культуру *C. perfringens* изучают по морфологическим, тинкториальным, культуральным, патогенным и токсигенным свойствам.

Эмфизематозный карбункул (эмкар). Острое инфекционное заболевание рогатого скота. Характеризуется развитием отечных крепитирующих припухлостей в мышечной ткани. К эмкару более восприимчив крупный рогатый скот, реже овцы и козы.

Возбудитель эмфизематозного карбункула — *C. chauvoei*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика эмкара основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование проводят по той же схеме, что и исследование на злокачественный отек.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего очага. Пораженный участок разрезают в глубину и из средней части мышцы отбирают кусочки ткани размером 3 см³. При вскрытии трупа берут также кусочки печени и селезенки, кровь сердца. Материал для лабораторного исследования отбирают не позднее чем через 4 ч после гибели животного. В жаркое время года материал консервируют стерильным 30%-м водным раствором глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. *C. chauvoei* — толстая крупная грамположительная палочка размером (0,5...1,6) × (1,5...9) мкм, возбудитель — перитрих, образует споры в культуре и тканях, капсулу не формирует. Из нативного материала готовят мазки-отпечатки и окрашивают по Граму. При микроскопии обнаруживают отдельные или попарно лежащие полиморфные (веретенообразные, шаровидные, грушевидные) грамположительные палочки со спорами, расположенными центрально или субтерминально или находящимися отдельно от вегетативной клетки; палочка со спорой может напоминать по форме точильный камень или разливательную ложку.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Строгий анаэроб, температурный оптимум 36...38 °С. Исследуемый материал высевают на среду Китта—Тароцци, глюкозо-кровяной агар, МПА, в МПБ. При поступлении несвежего материала из него готовят суспензию на физиологическом растворе (соотношение 1 : 4), которую прогревают при 80 °С 15...20 мин для уничтожения сопутствующей микрофлоры и только после этого делают посев на питательные среды. Посевы культивируют 24...48 ч.

При росте *C. chauvoei* на среде Китта—Тароцци сначала наблюдают равномерное помутнение бульона, распределяющееся по всему столбику. Через 20...24 ч среда начинает просветляться и через двое суток становится прозрачной, а на дне пробирки образуется осадок микробных клеток. Газообразование незначительное.

На агаре Цейслера обнаруживают характерный рост колоний

в виде перламутровой пуговицы или виноградного листа с образованием вокруг колоний неширокой зоны гемолиза.

Биопроба. Одновременно с посевами заражают лабораторных животных. Исследуемый материал измельчают, растирают в стерильной ступке с небольшим количеством МПБ. Полученную суспензию (соотношение 1 : 10) вводят подкожно в области брюшных мышц двум морским свинкам по 0,5...1 мл. При наличии в материале возбудителя животные погибают в течение 1...4 сут. У павших морских свинок на коже в месте инъекции наблюдают серозно-геморрагический выпот, кровоизлияния. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом, мышцы темнокрасного цвета, в паховых и реже подмышечных областях обнаруживают небольшие скопления газа. Кишечник не вздут, органы брюшной полости без видимых изменений.

В мазках-отпечатках с диафрагмальной поверхности печени обнаруживают отдельно лежащие палочковидные бактерии, что служит одним из дифференцирующих признаков от *C. septicum*, при заражении которым в аналогичных мазках обнаруживают нити или длинные цепочки. В случае необходимости возбудитель дифференцируют от *C. septicum* по критериям, изложенным в таблице 26.

26. Дифференциальные признаки *C. chauvoei* и *C. septicum*

| Признак | <i>C. chauvoei</i> | <i>C. septicum</i> |
|---|---|--|
| Ферментация сахарозы | + | - |
| Ферментация салицина | - | + |
| Морфология клеток в мазках с серозных покровов печени | Одиночные или парные клетки | Длинные нити |
| Расположение спор в клетке | Терминально, субтерминально | Чаще центрально |
| Патогенные свойства | Голуби устойчивы к экспериментальному заражению | Чувствительны все виды лабораторных животных |

Биопрепараты. Поливалентная концентрированная вакцина против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят состоит из смеси нативных токсических бульонных культур, обезвреженных теплом и формалином, сорбированных на геле гидроксида алюминия и затем концентрированных. Содержит *C. perfringens* типов В и D, *C. novyi* и *C. septicum*. Активность контролируют на кроликах после двукратной иммунизации путем определения количества антител в реакции нейтрализации.

Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец содержит анатоксины *C. perfringens* типов С и D и *C. septicum*, сорбированные на геле гидроксида алюминия. К готовым

анатоксинам *C. perfringens* добавляют 25 % вакцины *C. septicum*. Активность контролируют на овцах путем иммунизации с последующим определением количества антител в РН. Активность препарата относительно *C. septicum* устанавливают вакцинацией кроликов с последующим заражением смертельной дозой культуры.

Антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец получают иммунизацией волов-продуцентов анатоксинами *C. perfringens* типов С и D. Имунную сыворотку проверяют на активность в РН; 1 мл препарата должен содержать не менее 10 АЕ антитоксинов каждого типа.

Антитоксические сыворотки *C. perfringens* типов А, С, D и E для диагностики болезней животных, вызываемых *C. perfringens*, получают гипериммунизацией овец или валухов очищенными анатоксинами типов А, С, D и E. Сыворотки предназначены для идентификации токсинов *C. perfringens* в РН.

Гидроокисью алюминия вакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец представляет собой инактивированную формалином, сорбированную на геле гидроксида алюминия реакторную культуру *C. chauvoei*, концентрированную путем удаления 2/3 культуральной жидкости после сорбции. Активность препарата проверяют на морских свинках.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить морфологические, тинкториальные и культуральные свойства возбудителей, описать их признаки.
2. Провести вскрытие трупов морских свинок, приготовить окрашенные мазки-отпечатки, обнаружить возбудитель путем микроскопии.
3. Из органов и тканей провести посев материала на среду Китта-Тароцци с целью выделения культуры возбудителя.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают злокачественный отек?
2. Какие среды применяют для культивирования клостридий?
3. Каковы отличительные признаки *C. perfringens* от других клостридий—возбудителей злокачественного отека?
4. На каких животных ставят биопробу при эмфизематозном карбункуле?
5. Каковы морфологические и культуральные свойства возбудителя эмфизематозного карбункула?

Тема 27

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТОЛБНЯКА, БОТУЛИЗМА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики и биологическими свойствами возбудителей столбняка и ботулизма.

Оборудование и материалы. Белые мыши с клиническими признаками ботулизма и столбняка, готовые фиксированные мазки из культур *C. tetani*, *C. botulinum*, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Столбняк. Острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое токсином микроба *C. tetani*. Характеризуется повышенной возбудимостью и судорожными сокращениями мускулатуры тела, приводящими к асфикции, развивается в результате попадания спор возбудителя в раны. К возбудителю восприимчивы все виды домашних животных, особенно чувствительны лошади. Болезнь может возникнуть после родовых травм, кастрации, обрезания хвостов или пуповины у новорожденных, если при этих операциях были нарушены правила асептики и антисептики.

Возбудитель столбняка — *C. tetani*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика столбняка основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, биохимическим и токсигенным свойствам.

Материал для исследования. Клиническая картина столбняка характерна, поэтому материал направляют для лабораторного исследования в сомнительных случаях. Им служит раневой экссудат, кусочки ткани из глубоких слоев мест поражения.

Микроскопия препаратов из исходного материала. *C. tetani* — тонкая грамположительная спорообразующая палочковидная бактерия размером $(0,3...0,8) \times (3...12)$ мкм. Споры терминальные, круглые, в два-три раза крупнее клетки, что придает ей форму «барабанной палочки». Возбудитель — перитрих, капсулу не формирует.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *C. tetani* — строгий анаэроб, температурный оптимум 37 °С, рН 7,4...7,9. Исследование проводят с целью обнаружения токсина и выделения культуры возбудителя для последующего определения ее токси-

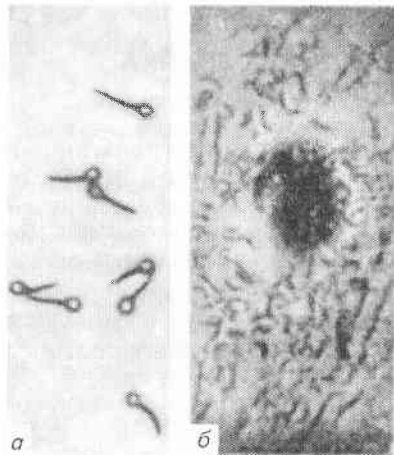


Рис. 92. *C. tetani*:

а — чистая культура; б — колония

генности. Чтобы выделить чистую культуру, материал высевают на среду Китта—Тароцци, содержащую 0,5% глюкозы. Половину посевов (пробирки) прогревают при 80 °С в течение 1 ч.

Через 24 ч на среде Китта—Тароцци возбудитель дает интенсивное помутнение среды с незначительным газообразованием. Через 48...72 ч наступает

просветление среды, а на дне пробирки образуется осадок. Для культуры характерен запах жженого рога (вследствие протеолиза белков).

Через 4...5 сут у полученной культуры определяют токсигенные свойства. При необходимости первичные посевы, содержащие типичные клетки возбудителя, прогревают при 80 °С 20 мин и делают дробный посев на глюкозо-кровяной агар в чашках Петри. На кровяном агаре *C. tetani* образует нежные колонии с отростками и приподнятым центром, иногда мелкие круглые колонии. Некоторые колонии окружены зоной гемолиза (рис. 92).

У чистых культур возбудителя исследуют биохимические свойства. *C. tetani* гидролизует желатину, не образует индол, лецитиназу, расщепляет до кислоты глюкозу, мальтозу, фруктозу, свертывает молоко, образует сероводород.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения токсина в исследуемом материале, а также для подтверждения токсигенных свойств выделенной культуры возбудителя. Для обнаружения токсина исследуемый материал растирают в физиологическом растворе, экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют. Фильтрат вводят подкожно в заднюю лапку двум-трем белым мышам по 0,5...1 мл или двум морским свинкам по 3...5 мл. При наличии токсина через 48...96 ч у животных развивается тетаническое сокращение мышц отдельных групп, а затем всей мускулатуры. Животное погибает в позе с вытянутыми лапками и искривлением позвоночника в сторону лапки, в которую вводили материал. При наличии токсина исследования по выделению культуры возбудителя прекращают.

Ботулизм. Это остро текущий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбу-

дителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы, а также люди. Из лабораторных животных — белые мыши и морские свинки.

Возбудитель ботулизма — *C. botulinum*.

Лабораторная диагностика ботулизма основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и его токсина методом биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и токсигенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы корма, вызвавшего отравление; от павших животных — содержимое желудка, кишечника, кусочки печени, селезенки; от больных животных — кровь. Материал берут в течение двух часов после гибели животного.

Нативный материал исследуют одновременно на наличие токсинов и возбудителя. Кровь исследуют только на токсин и быстро, на месте, так как токсин в крови быстро разрушается.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В препаратах из материала, окрашенных по Граму, *C. botulinum* обнаруживают в форме прямой или слегка изогнутой с закругленными концами грамположительной палочки размером (0,6...1,4) × (4...9) мкм. Споры овальные, больше диаметра клетки, располагаются терминально или субтерминально, придавая клетке вид «теннисной ракетки». Возбудитель образует жгутики, не формирует капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Основное направление при лабораторной диагностике ботулизма — обнаружение ботулинического токсина. Выделение чистой культуры с испытанием ее токсигенных свойств проводят только при отрицательных результатах исследований на наличие токсина в материале.

C. botulinum — строгий анаэроб, температурный оптимум 30...35 °С, рН 7,2...7,4. Чтобы выделить культуру возбудителя, исследуемый материал высевают в два флакона со средой Китта—Тароцци, один из них прогревают при 80 °С 1 ч, затем оба флакона инкубируют. Рост возбудителя характеризуется постепенным помутнением среды (на 2...3-и сутки), газообразованием. У культуры отмечают специфический запах прогорклого масла. В культуре обнаруживают типичные для возбудителя клетки бактерий. На 5...7-е сутки инкубирования испытывают токсигенные свойства культуры (см. биопробу). Для выделение чистой культуры возбудителя первичные посевы прогревают при 80 °С 1 ч и дробно рассеивают на глюкозо-кровяной агар в чашках Петри. Посевы инкубируют в анаэроостате. Через

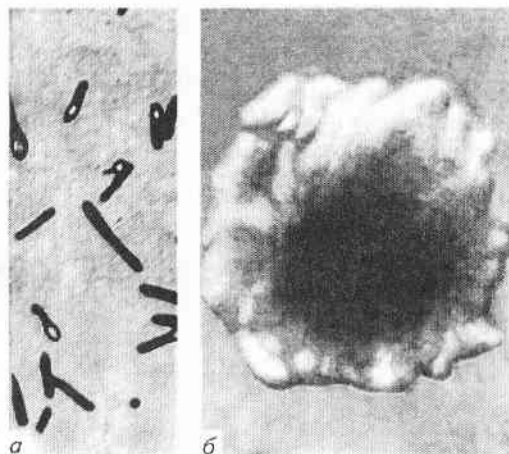


Рис. 93. *C. botulinum*:

а — чистая культура; б — колония

4...5 сут просматривают посеvy. Колонии *C. botulinum* круглые, с корневидными отростками, бесцветные или сероватые с зоной бета-гемолиза (рис. 93).

У выделенных культур определяют ферментативные свойства. Возбудитель медленно разжижает желатину, пентонизирует молоко, ферментирует до кислоты и газа глюкозу, мальтозу, салицин, глицерин, адонит.

Биопроба. Метод применяют для обнаружения токсина в исследуемом материале или для определения токсигенных свойств выделенной культуры возбудителя. *C. botulinum* продуцирует токсины семи типов: А, В, С, D, Е, F, G. Все семь сероваров экзотоксина иммунологически специфичны, что выявляют в реакции нейтрализации.

Для обнаружения токсина исследуемый материал (20...30 г) растирают в физиологическом растворе (в соотношении 1:2), экстрагируют при комнатной температуре 2 ч, фильтруют через вату и делят на две части, одну часть прогревают при 100 °С 20...30 мин. Затем нативным и прогретым фильтратом заражают внутривенно или внутривентрально двух белых мышей. Морских свинок заражают подкожно по 3...5 мл. При наличии ботулинического токсина животные, которым введен кипяченый фильтрат, остаются живыми, нативный — погибают на 2...5-е сутки с характерной клиникой ботулизма: шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западание брюшной стенки («осиная талия»).

При обнаружении в исследуемом материале токсина проводят его идентификацию. Для этого смешивают по 0,2 мл различных антисывороток в одной пробирке (А, В, С, D, Е), добавляют 1 мл экстракта, выдерживают 45 мин при 35...37 °С и вводят внутривентрально двум белым мышам. Контрольным животным вводят смесь фильтрата с физиологическим раствором. При выживании мышей, зараженных смесью фильтрата и сыворотки, и при гибели контрольных токсин идентифицируют как ботулинический. Этот результат служит достаточным основанием для постановки положительного диагноза на ботулизм. При необходимости определяют тип токсина в РН: смешивают по 2,4 мл фильтрата и 0,6 мл типовых сывороток, выдерживают в термостате и ставят биопробу на мышах, как было описано выше.

Биопрепараты. Столбнячный анатоксин представляет собой фильтрат токсинсодержащей бульонной культуры, инактивированной формалином при 39...40 °С в течение 25...30 сут. Затем к фильтрату добавляют алюмокалиевые квасцы, концентрируют удалением 80 % надосадочной жидкости и контролируют готовый препарат на стерильность, безвредность и активность иммунизацией морских свинок с последующим заражением 200 ДЛМ токсина.

Вакцину против ботулизма норок готовят из *C. botulinum* типа С. Бульонную токсинсодержащую культуру инактивируют формалином при 37 °С в течение 35 сут. В каждой серии вакцины количество анатоксина варьирует, что не позволяет рекомендовать для вакцинации животных одну постоянную дозу вакцины. Поэтому в опыте вакцинации с последующим прямым заражением на мышах рассчитывают ЕД₅₀ препарата (по методу Кербера) и, исходя из полученных данных, определяют рабочую дозу вакцины.

Ботулинические диагностические антитоксические сыворотки предназначены для идентификации ботулинических токсинов в реакции нейтрализации.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Окрасить по Граму мазки из культур возбудителей столбняка и ботулизма, зарисовать микроскопическую картину.
2. Изучить клиническую картину столбняка и ботулизма (лабораторные животные).
3. Проанализировать схемы лабораторной диагностики столбняка и ботулизма.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические и культуральные признаки возбудителя столбняка?
2. Каковы особенности бактериологического исследования при столбняке?
3. Какой материал направляют в лабораторию для диагностического исследования при ботулизме?
4. Как определяют тип токсина *C. botulinum*?

Тема 28

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕКРОБАКТЕРИОЗА И КОПЫТНОЙ ГНИЛИ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятий. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей и особенностями лабораторной диагностики некробактериоза, копытной гнили и биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культура *F. necrophorum* на среде Китта–Тароцци, кровяном (сывороточном) МПА, мазки из культур (патматериала) *B. nodosus*, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Некробактериоз. Инфекционное заболевание, характеризующееся гнойно-некротическим поражением кожи и подлежащих тканей, слизистых оболочек и паренхиматозных органов. К некробактериозу восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных, а также человек. Наиболее чувствителен молодняк.

Возбудитель некробактериоза — *Fusobacterium necrophorum*, род *Fusobacterium*, семейство Bacteroidaceae.

Лабораторная диагностика некробактериоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют трупы мелких животных целиком, от крупных животных — пораженные ткани и кусочки паренхиматозных органов с очагами некроза. Для прижизненной диагностики берут соскобы с участков поражения на границе здоровой и некротизированной ткани.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель — грамтрицательная, полиморфная бактерия, образующая длинные нити, неподвижная, без спор и капсул. Хорошо окрашивается фуксином Циля, синью Леффлера, а также по методу Муромцева и Романовского–Гимзы.

В мазках-отпечатках из пораженного органа возбудитель об-

наруживаются в виде грамтрицательных, длинных, иногда переплетающихся, неравномерно окрашенных нитей (рис. 94).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *F. necrophorum* — облигатный анаэроб и может расти на обычных для анаэробов средах (среда Китта–Тароцци, бульон Мартена, печеночный бульон Хоттингера, мозговая среда, сывороточный и глюкозо-кровоный агар), при 37...38 °С, рН 7,4...7,6. Исследуемый материал высевают на среду Китта–Тароцци, МПА, в МПБ.

На среде Китта–Тароцци возбудитель через 24...48 ч вызывает интенсивное помутнение сначала нижнего слоя, а позднее и всей среды. Газообразование очень слабое, отмечают в первые часы роста. Через 5...8 сут наблюдаются просветление бульона с выпадением порошкообразного осадка. При высеве на плотные среды рост появляется через 48...72 ч в виде мелких росинок диаметром около 1 мм, через 4...5 сут колонии увеличиваются в размере, становятся хорошо заметными невооруженным глазом, окрашены в серовато-белый или зеленоватый цвет, края колоний ровные или немного зубчатые. На глюкозном агаре с эритроцитами кролика некоторые штаммы образуют зону альфа- или бета-гемолиза. В столбике с сывороточным агаром на четвертые-пятые сутки вырастают чечевицеобразные колонии с нитевидными отростками. В связи с тем что получение чистой культуры на питательных средах затруднительно, ее целесообразно выделять методом биопробы.

У выделенных культур изучают ферментативную активность. Возбудитель образует индол, сероводород, разлагает с образованием кислоты и незначительного количества газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, слабо ферментирует лактозу, не разжижает желатину и свернутую сыворотку, не редуцирует нитраты.

Биопроба. Одновременно с посевами заражают кролика суспензией из исследуемого материала с физиологическим раствором, которую вводят в объеме 0,5...1 мл под кожу средней трети наружной поверхности уха. Для заражения можно использовать суточную бульонную культуру возбудителя в тех же объемах. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 дней.

При наличии в исследуемом материале *F. necrophorum* у кролика через 3...4 дня на месте инъекции развивается некроз. Из оча-

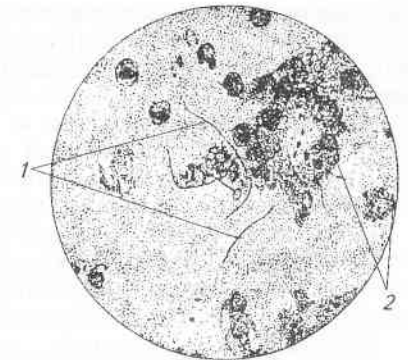


Рис. 94. *F. necrophorum* — мазок из патологического материала (по Коваленко):
1 — нитевидные клетки возбудителя; 2 — тканевые элементы

га некроза делают мазки и окрашивают одним из методов. Пробу считают положительной при обнаружении в мазках зернистоокрашенных грамотрицательных нитей возбудителя некробактериоза.

Биопрепараты. «Нековак» — ассоциированная вакцина против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота.

Двухкомпонентная вакцина «Нековак» с иммуностимулятором ГМДП (глюкозаминилмурамилпептид).

Копытная гниль. Это хроническое инфекционное заболевание овец и коз. Характеризуется воспалением кожи межкопытной щели, отслоением и гнилостным распадом роговой ткани копыта вплоть до полного отхождения рогового башмака.

Возбудитель копытной гнили — *Bacteroides nodosus*, род *Bacteroides*, семейство Bacteroidaceae.

Лабораторная диагностика копытной гнили основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя световую, люминесцентную микроскопию и биологическую пробу.

Материал для исследования. В лабораторию направляют мазки-отпечатки из свежеприготовленных тканей, мазки из слизи и слизи с кожи межкопытной щели, кусочки тканей с границы здоровых и пораженных участков, пораженные копыта от вынужденно убитых животных. Материал исследуют от нелеченых и не подвергавшихся обработке дезинфицирующими препаратами животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель копытной гнили представляет собой грамотрицательную палочку размером (1...1,7) × 3,6 мкм, неподвижную, без спор и капсул.

Мазки-отпечатки из нативного материала и доставленные мазки для исследования окрашивают по Граму и микроскопируют. *B. nodosus* обнаруживают в виде грамотрицательных, прямых или слегка изогнутых крупных палочек, иногда с утолщениями на одном или обоих концах. Располагаются поодиночке или парами. В мазках из нативного материала могут быть окружены радиально отходящими от них мелкими грамотрицательными палочками (феномен Бевериджа). Для обнаружения возбудителя в материале используют непрямой метод иммунофлуоресценции.

Биопроба. Метод применяют при получении сомнительных результатов микроскопических исследований. В опыт берут овец из благополучных по копытной гнили хозяйств, которых для мацерации копыт в течение 10 дней до постановки пробы содержат на влажной подстилке.

Двум овцам скарифицируют кожу межкопытных щелей (делают 10...15 надрезов эпидермиса до появления лимфы) двух конечностей — передних и задних и втирают в поврежденный участ-

ток исследуемый материал или его суспензию на физиологическом растворе. В межкопытные щели дополнительно вставляют тампоны из обезжиренной шерсти, пропитанные этой же суспензией. Через 4 дня в положительных случаях обнаруживают признаки болезни. Наблюдение за животными ведут в течение 15 дней. От заболевших животных берут материал, делают мазки-отпечатки для световой и люминесцентной микроскопии. При положительном результате биопробы в мазках обнаруживают возбудитель копытной гнили.

Биопрепараты. Вакцина против копытной гнили овец инактивированная, эмульгированная.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить мазки из культур *F. necrophorum*, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Изучить культуральные свойства *F. necrophorum*.
3. Промикроскопировать препараты, содержащие *B. nodosus*.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Какие среды используют для культивирования возбудителя некробактериоза?
2. Каковы морфологические особенности возбудителя некробактериоза?
3. Как ставят биопробу при диагностике копытной гнили?
4. Как ставят реакцию иммунофлуоресценции при диагностике копытной гнили?

Тема 29

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭШЕРИХИОЗОВ (КОЛИ-ИНФЕКЦИИ). БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики и биологическими свойствами возбудителей эшерихиозов.

Оборудование и материалы. Культуры *E. coli* на МПА, средах Эндо, Левина, Симмонса, пластины ПБДЭ с результатами тестирования ферментативной активности *E. coli*, пробирки цветного ряда с культурой *E. coli* (лактоза, глюкоза, индол, среда с мочевиной), наборы агглютинирующих антиадгезивных и О-коли-сывороток, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Эшерихиоз (колибактериоз). Острая инфекционная болезнь. Проявляется профузным поносом, признаками тяжелой инток-

сикации и обезвоживанием организма. Болеет молодняк сельскохозяйственных животных многих видов, включая птиц. Эшерихиоз может протекать в энтеритной, септической и энтеротоксемической формах.

Возбудители колибактериоза (эшерихиоза) — патогенные варианты бактерии *E. coli*, род *Escherichia*, семейство Enterobacteriaceae.

При энтеритной форме болезни возбудитель локализуется в кишечнике и регионарных брыжеечных лимфоузлах; при септической форме — в крови, внутренних органах и тканях; при энтеротоксемической — в тонком отделе кишечника и брыжеечных лимфоузлах. Считают, что ведущая роль в развитии эшерихиоза принадлежит кишечным палочкам, адгезивные антигены которых (K 88, K 99, F 41, 987 P, A 20 и др.) обеспечивают прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам тонкого отдела кишечника с последующим их размножением в клетках, продуцированием энтеротоксинов и проникновением сначала в регионарные лимфоузлы, а затем в кровь.

Эшерихии в своем составе содержат 164 варианта O-антигена, 55 вариантов H-антигена и 90 вариантов K-антигена.

O-Антиген (соматический) термостабильный, состоит из полисахаридно-липидно-протеинового комплекса, который определяет серогрупповую принадлежность бактерий (известно свыше 160 серологических групп эшерихий).

K-Антиген (поверхностный) подразделяют на три вида, которые обозначают латинскими буквами L, B и A. L- и B-антигены термолабильные, разрушаются при 100 °С в течение 1 ч. A-антиген (капсульный) термостабильный, разрушается при автоклавировании (121 °С) в течение двух часов, обнаружен у бактерий некоторых серологических групп (08, 09, 0101 и др.). Поверхностные (L, B, A) антигены препятствуют агглютинации бактерий соответствующей агглютинирующей O-сывороткой, поэтому при серогрупповой типизации культур эшерихий их подвергают термической обработке: прогреванию в водяной бане или автоклавированию.

H-Антиген (жгутиковый) термолабильный, белковой природы, обнаружен у подвижных штаммов эшерихий. Сочетание O-, K- и H-антигенов характеризует серологический вариант (серовар) бактерий.

Эпизоотические вспышки колибактериоза наиболее часто вызывают патогенные штаммы эшерихий следующих серогрупп: у телят — 08, 09, 015, 020, 026, 035, 078, 086, 0101, 0115, 0117, 0119, 0141, реже 02, 033, 041, 055, 0103, 0127, 0137; у поросят — 06, 026, 033, 0101, 0136, 0139, 0141, 0142, 0149, 0152, 0157; у ягнят — 04, 08, 09, 015, 020, 028, 035, 041, 078, 0101, 0137; у птиц — 01, 02, 08, 015, 018, 026, 055, 078, 0111, 0113, 0128, 0141.

У поросят-отъемышей энтеротоксемическая форма колибактериоза называется отечной болезнью.

Клинические признаки колибактериоза: слабость, потеря аппетита, угнетенное состояние животных, обезвоживание организма вследствие диареи. При затяжном течении наблюдают также серозно-гнойные выделения из носовых отверстий, артриты.

Отечная болезнь у поросят-отъемышей характеризуется появлением отеков век, носовой части головы, подчелюстной области. Нарушается координация движений, отмечают судороги, парезы, гиперемии кожи ушей, пяточка, живота. Иногда наблюдают кратковременное повышение температуры тела в начале болезни.

Лабораторная диагностика эшерихиоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры, идентификацию возбудителя на уровне вида и определение его принадлежности к группе патогенных вариантов.

Материал для исследования. Для прижизненной бактериологической диагностики колибактериоза в лабораторию направляют фекалии больных животных (не менее чем от 5 животных с одной фермы), не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Пробы фекалий массой 1...2 г от каждого животного берут из прямой кишки в стерильные пробирки с помощью прокипяченного резинового катетера.

Микроскопия мазков из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму. *E. coli* — палочковидная грамотрицательная бактерия размером (0,3...1) × (1...6) мкм со жгутиками (за редким исключением), спор и капсул не образует. Микробные клетки располагаются одиночно, парно или в виде коротких цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *E. coli* — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37...38 °С, pH 7,2...7,4, к питательным средам нетребователен. Посевы из паренхиматозных органов, костного и головного мозга, брыжеечных лимфоузлов и тканей животных делают на среду Эндо или Левина методом отпечатков или наносят материал на поверхность среды пастеровской пипеткой и равномерно растирают шпательем.

Пробы фекалий (не более 0,5 г) или соскобы со слизистой оболочки кишечника от каждого животного помещают в отдельную стерильную пробирку, затем разводят в 10 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают и выдерживают 10...15 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость засевают бактериологической петлей в чашки со средой Эндо или Левина для получения изолированных колоний.

На второй день просматривают чашки и отбирают 10 колоний, выросших при посеве фекалий, и 5 колоний, выросших при

посеве тканевых органов, характерных для эшерихий: круглых, с ровными краями, с гладкой выпуклой поверхностью, размером 2...4 мм, малинового цвета — на среде Эндо и темно-фиолетового — на среде Левина. Иногда у колоний отмечают металлический блеск.

Колонии пересевают на МПА и среду Минка. При поддержании на обычных средах эшерихии быстро утрачивают адгезивные факторы, при культивировании на среде Минка — сохраняют. В состав указанной среды входят буфер (рН 7,5), соли магния, марганца, хлорид железа, хлорид кальция, гидролизат лактальбумина, глюкоза, агар. При подозрении на отечную болезнь порослят дополнительно делают высев на кровяной МПА, поскольку штаммы, вызывающие эту патологию, обычно синтезируют бета-гемолизин.

На МПА *E. coli* образует круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью и ровными краями колонии (S-форма) (рис. 95), возможно появление R-форм. Из культур, выросших на МПА и среде Минка, делают мазки и окрашивают по Граму.

При обнаружении бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для *E. coli*, биохимические свойства не изучают, а сразу исследуют в РА на стекле с агглютинирующими антиадгезивными сыворотками вначале с комплексной, а затем при получении положительного результата с моновалентными сыворотками. Результат реакции учитывают в течение одной минуты. Контролем служат: 1) исследуемая культура + физиологический раствор; 2) культура + нормальная кроличья сыворотка, разведенная в соотношении 1:10.

Культуры, выросшие на МПА, проверяют с сыворотками К 88, 987 Р и А 20, культуры со среды Минка — с сыворотками К 99 и F 41. При положительной РА культуры относят к возбудителям эшерихиоза и на этом заканчивают их дальнейшее изучение.

При отсутствии эшерихий с адгезивными антигенами культуру идентифицируют на основании изучения ферментативных признаков. Для *E. coli* характерно расщепление глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, выделение

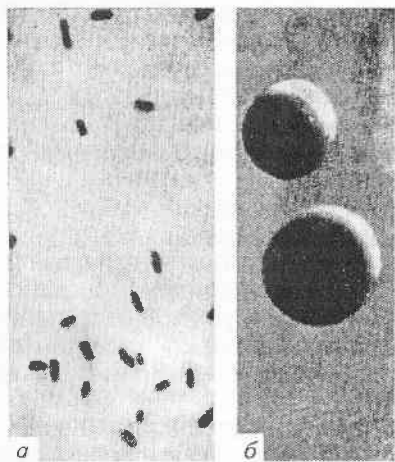


Рис. 95. *E. coli*:

а — чистая культура; б — колония

индола, отсутствие уреазы и неспособность утилизировать цитраты. У культур, идентифицированных как *E. coli*, устанавливают O-серогрупповую принадлежность как косвенный показатель патогенности или изучают патогенность в биопробе на белых мышах, цыплятах.

O-Серогруппу эшерихий устанавливают следующим образом. Культуры, выращенные на скошенном МПА при 37 °С в течение 18...20 ч, смывают физиологическим раствором, переносят в сухие стерильные пробирки, прогревают в водяной бане при 100 °С 1 ч для разрушения поверхностных термолabileльных L- и В-антигенов или автоклавируют при 120 °С 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 2000...3000 мин⁻¹ 10...15 мин и осадок используют в качестве антигена для постановки РА на стекле. Оставшуюся часть антигена разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации клеток 5 · 10⁸/мл и ставят пробирочную РА.

Определение серогрупповой принадлежности культур начинают с постановки РА на стекле с групповыми поливалентными сыворотками: на чистое обезжиренное стекло наносят по капле поливалентные сыворотки. В каждую каплю петлей вносят осажденную центрифугированием культуру и хорошо смешивают, результат учитывают в течение 3 мин. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и просветлением жидкости. При отрицательном результате вся капля остается мутной.

Антиген, агглютинирующийся одной из поливалентных групповых сывороток, исследуют в РА на стекле с моновалентными сыворотками, разведенными в соотношении 1:10 и входящими в состав данной поливалентной сыворотки. Затем с моновалентной сывороткой, давшей положительную реакцию, ставят РА в пробирках в объеме 1 мл. Сыворотку разводят физиологическим раствором 1:25 до титра, указанного на этикетке: сначала готовят исходное разведение — к 2,4 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл сыворотки, в остальные пробирки разливают по 0,5 мл физиологического раствора, из исходного разведения переносят 0,5 мл смеси во вторую, перемешивают, из второй — в третью и т. д., из последней пробирки удаляют 0,5 мл смеси, из первой — 1,5 мл. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл антигена. Одновременно ставят контроли: 1) антиген + физиологический раствор (для исключения самоагглютинации); 2) сыворотка, разведенная 1:25 без антигена (для исключения флоккуляции). Все пробирки встряхивают, выдерживают в термостате при 37 °С 16...18 ч и затем при комнатной температуре — 6...8 ч. Читают реакцию при помощи агглютиноскопа.

Результаты учитывают по общепринятому методу и обозначают в крестах (++++, +++, ++, +, —).

Биопроба. Готовят суспензию культуры в физиологическом ра-

створе с концентрацией клеток $1 \cdot 10^9$ /мл по бактериальному стандарту мутности и вводят по 0,5 мл внутривенно трем белым мышам массой 14...16 г и трем цыплятам трех-четырёхнедельного возраста (при исследовании материала от птиц). За животными ведут наблюдение в течение трех суток. В случае гибели двух зараженных мышей и более или цыплят выделенную культуру считают патогенной.

Биопрепараты. Вакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсальная против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят.

Вакцина поливалентная против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей.

Коли-протектан ВИЭВ.

Сыворотка поливалентная против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных.

Сыворотки О-коли агглютинирующие.

Коли-адгезин-тест: антиадгезивные коли-сыворотки К 88, К 99, 987 Р, А 20, F 41.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *E. coli*.

2. Изучить ферментативные свойства *E. coli*.

3. Определить у культур *E. coli* адгезивные антигены и О-сегруппы в РА на стекле.

Контрольные вопросы

1. Какие дифференциально-диагностические среды применяют для выделения *E. coli*?
2. Каковы основные биохимические свойства *E. coli*?
3. Как определяют патогенность *E. coli*?

Тема 30

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА САЛЬМОНЕЛЛЕЗА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики, биологическими свойствами сальмонелл и биопрепаратами, применяемыми при сальмонеллезе.

Оборудование и материалы. Культуры сальмонелл на МПА, МПБ, агаре Эндо, агаре Плоскирева, среде Олькеницкого или Ресселя, ПБДЭ-пластинах. Набор сальмонеллезных сывороток О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих для экспресс-идентификации сальмонелл в реакции агглютинации на стекле.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Сальмонеллезы. Группы инфекционных заболеваний преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных (телят, поросят, жеребят, ягнят, пушных зверей, птиц), а также человека. Телята чаще заболевают в возрасте старше двух недель, поросята — от 1 до 4 мес. Овцы могут болеть сальмонеллезом с первых дней жизни. У молодняка птиц сальмонеллы вызывают массовую гибель. Бактерии, размножаясь в кишечнике, вызывают воспаление слизистой оболочки, проникают в кровь, развивается септицемия. Характерна следующая клиническая картина: угнетенное состояние животного, высокая температура, диарея. Заболевание беременных животных ведет к абортам и рождению нежизнеспособного потомства. Возможно развитие бронхопневмоний и артритов.

Возбудители сальмонеллеза — бактерии рода *Salmonella*, семейства Enterobacteriaceae. Род *Salmonella* по ферментативной активности условно подразделяют на подроды (I, II, III, IV, V). Большинство сальмонелл, выделяемых от животных, входит в подрод I (*S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. abortusovis*, *S. typhisuis* и др.). Сальмонеллы внутри рода идентифицируют по антигенной структуре: известно свыше 2200 серологических вариантов сальмонелл, каждый из которых характеризуется определенным набором О- и Н-антигенов (табл. 27).

27. Антигенная структура групп сальмонелл, в которые входят патогенные для животных сероварианты

| Группа | Название серовариантов | О-Антиген | Н-Антиген | | |
|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|--------|
| | | | 1-я фаза | 2-я фаза | |
| A (02) | <i>S. paratyphi</i> A | 1, 2, 12 | a | (1, 5) | |
| B (04) | <i>S. paratyphi</i> B | 1, 4, (5), 12 | b | 1, 2 | |
| | <i>S. typhimurium</i> | 1, 4, (5), 12 | i | 1, 2 | |
| | <i>S. abortusequi</i> | 4, 12 | — | e, n, x | |
| | <i>S. abortusbovis</i> | 1, 4, 12, 27 | b | e, n, x | |
| | <i>S. abortusovis</i> | 4, 12 | c | 1, 6 | |
| | <i>S. brandenburg</i> | 1, 4, 12 | 1, v | e, n, z ₁₅ | |
| | <i>S. stanleyville</i> | 1, 4, (5), 12, 27 | z ₄ , z ₂₃ | (1, 2) | |
| | <i>S. heidelberg</i> | 1, 4, (5), 12 | r | 1, 2 | |
| | <i>S. derby</i> | 1, 4, (5), 12 | f, g | (1, 2) | |
| | <i>S. reading</i> | 1, 4, (5), 12 | e, h | 1, 5 | |
| | <i>S. abony</i> | 1, 4, (5), 12, 27 | b | e, n, x | |
| | <i>S. stanley</i> | 1, 4, (5), 12, 27 | d | 1, 2 | |
| | <i>S. saintpaul</i> | 1, 4, (5), 12 | e, h | 1, 2 | |
| | <i>S. altendorf</i> | 4, 12, 27 | c | 1, 7 | |
| | C ₁ (06, 7) | <i>S. choleraesuis</i> | 6, 7 | (c) | (1, 5) |
| | | <i>S. paratyphi</i> C | 6, 7 (Vi) | c | 1, 5 |
| <i>S. typhisuis</i> | | 6, 7 | c | 1, 5 | |
| <i>S. oranienburg</i> | | 6, 7 | m, t | — | |
| <i>S. Thompson</i> | | 6, 7 | k | 1, 5 | |
| <i>S. potsdam</i> | | 6, 7 | 1, v | e, n, z ₁₅ | |

Продолжение

| Группа | Название серовариантов | О-Антиген | Н-Антиген | | |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | | | 1-я фаза | 2-я фаза | |
| C ₂ (06, 8) | <i>S. virchow</i> | 6, 7 | r | 1, 2 | |
| | <i>S. bareilly</i> | 6, 7 | y | 1, 5 | |
| | <i>S. tennessee</i> | 6, 7 | Z ₂₉ | (1, 2, 7) | |
| | <i>S. muenchen</i> | 6, 8 | d | 1, 2 | |
| | <i>S. newport</i> | 6, 8 | e, h | 1, 2 | |
| C ₃ (08, 20) | <i>S. bovis morbificans</i> | 6, 8 | r | 1, 5 | |
| | <i>S. kentucky</i> | 8, 20 | i | Z ₆ | |
| D ₁ (09, 12) | <i>S. typhi</i> | 9, 12, (Vi) | d | — | |
| | <i>S. enteritidis</i> | 1, 9, 12 | g, m | (1, 7) | |
| | <i>S. dublin</i> | 1, 9, 12, (Vi) | g, p | — | |
| | <i>S. rostock</i> | 1, 9, 12 | g, p, u | — | |
| | <i>S. moskow</i> | 9, 12 | g, q | — | |
| | <i>S. gallinarum-pullorum</i> | 1, 9, 12 | — | — | |
| | <i>S. easbourne</i> | 1, 9, 12 | e, h | 1, 5 | |
| | <i>S. panama</i> | 1, 9, 12 | l, v | 1, 5 | |
| | <i>S. sendai</i> | 1, 9, 12 | a | 1, 5 | |
| | E ₁ (03, 10) | <i>S. anatum</i> | 3, 10 | e, h | 1, 6 |
| | | <i>S. meleagridis</i> | 3, 10 | e, h | 1, w |
| | | <i>S. london</i> | 3, 10 | l, v | 1, 6 |
| | | <i>S. veltevreden</i> | 3, 10 | r | Z ₆ |
| <i>S. give</i> | | 3, 10 | l, v | 1, 7 | |
| <i>S. amager</i> | | 3, 10 | y | 1, 2 | |
| <i>S. muenster</i> | | 3, 10 | e, h | 1, 5 | |
| <i>S. newington</i> | | 3, 15 | e, h | 1, 6 | |

Примечание. (—) — антиген может отсутствовать.

Лабораторная диагностика сальмонеллеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют паренхиматозные органы или их части: печень с желчным пузырем, почку, мезентериальные лимфатические узлы, трубчатую кость, сердце, перевязанное у основания аорты лигатурой. Погибшие в 12...18-дневном возрасте эмбрионы птиц (до 30 шт.) и павшую птицу (до 10 гол.), абортирванные плоды с плодными оболочками и околоплодной жидкостью, а также свежие трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком. При подозрении на хроническую форму от телят дополнительно берут измененные участки легких, от кур — измененные фолликулы яичника. Материалом для прижизненной диагностики служат фекалии больных животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму, обрабатывают сальмонеллезными

люминесцирующими сыворотками и микроскопируют. Сальмонеллы представляют собой грамтрицательные палочки размером (2...4) × (0,7...1,5) мкм, располагающиеся одиночно. Спор и капсул не образуют. Подвижные, за исключением *S. pullorum*. Положительным результатом люминесцентной микроскопии считают высечение типичных для сальмонелл форм не ниже чем на два креста.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Сальмонеллы — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37...38 °С, рН 7,2...7,4. Исследуемый материал высевают в МПБ, в чашки Петри с МПА и одной из плотных дифференциально-диагностических сред (Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфитный агар). При подозрении на хроническое течение сальмонеллеза делают посевы на одну из сред обогащения (селенитовая, Мюллера, Кауфмана, Киллиана). Посевы инкубируют 16...20 ч, после чего просматривают невооруженным глазом, отмечая колонии, характерные для сальмонелл.

Сальмонеллы на средах Эндо и Плоскирева формируют прозрачные бесцветные колонии, на среде Левина — голубоватые, на висмут-сульфитном агаре — черные с металлическим блеском, за исключением *S. choleraesuis*, *S. abortusovis*, *S. gallinarum-pullorum*, которые на висмут-сульфитном агаре образуют нежно-зеленые колонии. На мясо-пептонном агаре сальмонеллы растут в виде гладких, прозрачных, бесцветных колоний с ровными краями (рис. 96); в мясо-пептонном бульоне — с диффузным помутнением среды. При отсутствии колоний сальмонелл на МПА, дифференциально-диагностических средах и наличии роста бактерий, похожих на сальмонеллы, в средах обогащения из последних делают высев на плотные среды, чтобы получить изолированные колонии. Из подозрительных колоний делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении бактерий, типичных

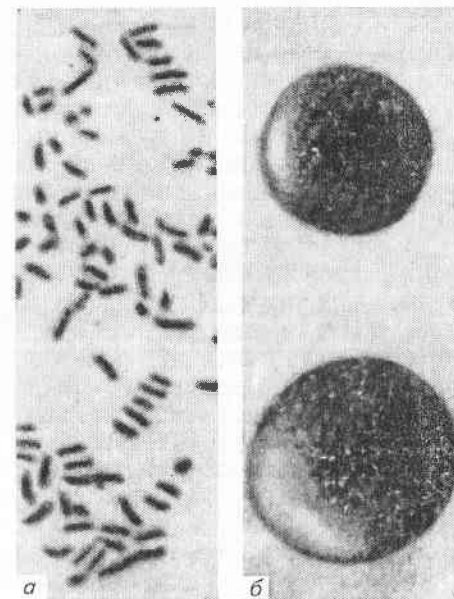


Рис. 96. Сальмонеллы:

а — чистая культура; б — колонии

по морфологическим и тинкториальным свойствам для сальмонелл, у них изучают ферментативные свойства.

Подозрительные на сальмонеллы колонии пересевают в пробирки с комбинированными средами Олькеницкого или Ресселя.

Среда Олькеницкого: агар питательный сухой — 25 г, лактоза — 10 г, аммоний-железо сульфат (соль Мора) — 0,2 г, тиосульфат натрия — 0,3 г, мочевины — 10 г, 0,4%-й водный раствор фенолового красного — 4 мл, дистиллированная вода — 1000 мл. Соли предварительно растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды. Углеводы и мочевины также растворяют в небольших объемах воды при подогревании на водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в оставшемся объеме воды при нагревании и помешивании. Затем все компоненты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают рН 7,2...7,4, добавляют индикатор и разливают в пробирки по 6...7 мл. Среду стерилизуют текущим паром три дня по 20 мин и скашивают, оставляя столбик среды высотой 2...2,5 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

Среда Ресселя: к 100 мл 1,5%-го мясо-пептонного агара (рН 7,2) прибавляют 1 % лактозы, 0,1 % глюкозы и 1 мл индикатора Андреде, среду разливают в пробирки по 5...6 мл, стерилизуют в автоклаве при 112 °С 20 мин и скашивают, оставляя столбик среды высотой 2...3 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

В состав сухой среды Ресселя входит сухой питательный агар, индикатор ВР, лактоза и глюкоза. Приготовленную среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют текущим паром два раза по 30 мин. Среду скашивают, оставляя столбик 2...2,5 см. Готовая среда фиолетового или розовато-серого цвета. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С 18...20 ч.

Учет биохимических свойств сальмонелл на указанных средах — визуальный, по изменению цвета среды. На среде Олькеницкого появление желтой окраски в скошенной части агара характеризует ферментацию лактозы и сахарозы; в столбике — глюкозы. Газообразование устанавливают по появлению пузырьков, разрывам агара или его отслоению от стенок пробирки. Об образовании сероводорода судят по почернению среды. При росте культуры, гидролизующей мочевины, среда Олькеницкого приобретает красно-малиновый цвет. На среде Ресселя определяют ферментацию глюкозы в столбике по изменению окраски и лактозы в скошенной части. Цвет среды меняется в зависимости от индикатора, входящего в состав среды: индикатор Андреде дает малиновую окраску, а индикатор ВР — синюю. Газообразование устанавливают также по появлению пузырьков и разрывам агара.

Для дальнейшего исследования отбирают культуры, не утилизирующие мочевины, ферментирующие глюкозу, не разлагающие сахарозу и лактозу, образующие сероводород. Такие культуры пересевают со среды Олькеницкого в среду Гисса с маннитом, в полужид-

кий агар для определения подвижности и ставят пробу на индол. Дополнительно делают пересев на МПА, чтобы накопить чистую культуру возбудителя для постановки реакции агглютинации.

При выделении культур с ферментативными свойствами, характерными для представителей рода сальмонелл (ферментируют глюкозу, маннит, не утилизируют лактозу, сахарозу, не расщепляют мочевины, не образуют индол, не разжижают желатину, растут на агаре Симмонса, т. е. усваивают цитратно-аммонийные соли), проводят их серологическую идентификацию.

Антигенную структуру сальмонелл выявляют с помощью наборов сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сывороток в РА на стекле. Сыворотки выпускают наборами № 1 и № 2 в двух коробках (табл. 28).

28. Состав наборов

| Набор № 1 (комплексные сыворотки) | | Набор № 2 (монорецепторные сыворотки) | | |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|----------|--------------|
| номер О-комплексных сывороток | рецепторный состав комплексных сывороток | О | Н | |
| | | | 1-й фазы | 2-й фазы |
| 1 | 4, 7, 8, 9, 10, 15, 19 | 6 | i m | e, n, x |
| 2 | 4, 11, 16, 17, 18, 21, 28 | 14 | c t | 2 |
| 3 | 7, 11, 30, 35, 38, 39, 40 | 46 | r p | 5 |
| 4 | 8, 16, 30, 41, 42, 43, 44 | 34 | e h | 6 |
| 5 | 9, 17, 35, 41, 45, 47, 48 | 20 | l v | (1, 2, 5, 6) |
| 6 | 10, 18, 38, 42, 45, 50, 52 | | d | |
| 7 | 15, 21, 39, 43, 47, 50, 53 | | b | |
| 8 | 19, 28, 40, 44, 48, 52, 53 | | g | |

Исследуемую культуру выращивают на скошенном мясо-пептонном агаре при 37...38 °С в течение 18...24 ч.

Первоначально культуру испытывают с О-комплексными сыворотками. Для этого реакцию агглютинации на стекле ставят с каждой О-комплексной сывороткой, начиная с первой, до получения положительной реакции с двумя сыворотками (табл. 29).

29. Серогрупповая принадлежность сальмонелл по результатам РА

| Сальмонеллы | | |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| агглютинируются комплексными сыворотками | содержат О-антиген | относятся к серогруппе |
| 1 и 2 | 04 | В |
| 1 и 3 | 07 | С ₁ или С ₄ |
| 1 и 4 | 08 | С ₂ или С ₃ |
| 1 и 5 | 09 | Д ₁ или Д ₂ |
| 1 и 6 | 010 | Е ₁ |
| 1 и 7 | 015 | Е ₂ или Е ₃ |
| 1 и 8 | 019 | Е ₄ |
| 2 и 3 | 011 | F |
| 2 и 4 | 016 | J |
| 2 и 5 | 017 | I |

| Сальмонеллы | | |
|--|--------------------|------------------------|
| агглютинируются комплексными сыворотками | содержат О-антиген | относятся к серогруппе |
| 2 и 6 | 018 | K |
| 2 и 7 | 021 | L |
| 2 и 8 | 028 | M |
| 3 и 4 | 030 | N |
| 3 и 5 | 035 | O |
| 3 и 6 | 038 | P |
| 3 и 7 | 039 | Q |
| 3 и 8 | 040 | R |
| 4 и 5 | 041 | S |
| 4 и 6 | 042 | T |
| 4 и 7 | 043 | U |
| 4 и 8 | 044 | V |
| 5 и 6 | 045 | W |
| 5 и 7 | 047 | X |
| 5 и 8 | 048 | Y |
| 6 и 7 | 050 | Z |
| 6 и 8 | 052 | 52 |
| 7 и 8 | 053 | 53 |

Чтобы определить серотиповую принадлежность, сальмонеллы, отнесенные к определенной серогруппе, исследуют с Н-моносыворотками 1-й и 2-й фазы. При выборе сывороток для реакции исходят из антигенной структуры сальмонелл той группы, к которой отнесена определяемая культура, с учетом вида животного.

Культуры сальмонелл, которые не удалось идентифицировать сыворотками из набора, следует направлять в Государственный институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

Техника постановки РА: из флакона, не захватывая осадка борной кислоты, пастеровской пипеткой набирают сыворотку, одну каплю которой наносят на предметное стекло. Бактериологической петлей в нее вносят 20...24-часовую исследуемую агаровую культуру сальмонелл. Для РА с О-сыворотками культуру берут с верхней части агара, с Н-сыворотками — с нижней, вблизи конденсационной жидкости. Петлю с культурой увлажняют в капле сыворотки, затем культуру тщательно растирают рядом с каплей, смешивают с сывороткой и энергично (6...10 раз) покачивают стекло круговыми движениями. Агглютинация наступает не позднее 1...2 мин. О-Агглютинат выглядит как плотные, с трудом разбивающиеся комочки и зернышки; Н-агглютинат — крупные, рыхлые, легко разбивающиеся хлопья. Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости. При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную взвесь.

Агглютинирующие адсорбированные О- и Н-сыворотки выпускают согласно серологической классификации бактерий рода

сальмонелл наборами и отдельными рецепторами. Кроме монорецепторных О- и Н-сывороток производят поливалентную сальмонеллезную О-сыворотку против сальмонелл основных пяти групп (А, В, С, D, Е). Наборы О- и Н-сывороток выпускают двух видов. Узкий набор состоит из 28 рецепторов. Расширенный набор включает в себя 108 рецепторов.

Монорецепторные О- и Н-сыворотки применяют для идентификации бактерий рода *Salmonella* в реакции агглютинации на предметном стекле, поливалентную — для отбора культур из первичных посевов.

Поливалентная сыворотка против сальмонелл основных групп содержит О-агглютинины против антигенов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 19, 26 и vi.

При агглютинации культуры с О-сывороткой определяют ее групповую принадлежность. Затем при помощи Н-сывороток соответствующей группы окончательно устанавливают тип исследуемой культуры.

Сухие сыворотки перед употреблением растворяют в стерильном физиологическом растворе из расчета 2 мл на ампулу, что соответствует первоначальному объему сыворотки до высушивания. Растворенные сыворотки используют в реакции агглютинации на стекле. Методика постановки РА на стекле такая же, как и с комплексными сыворотками.

Биопроба. Метод применяют в необходимых случаях, например при выделении нетипируемых серологически сальмонелл. Исследуемую культуру вводят подкожно белым мышам по 0,2...0,3 мл при концентрации клеток $(0,5...1) \cdot 10^8$ /мл. В положительных случаях животные гибнут в течение 3...10 сут.

Серологическая диагностика входит в состав лабораторной и заключается в постановке РА. Используют свежие сыворотки от животных или сыворотки, консервированные фенолом (до 0,5%), со сроком их давности не свыше 15 дней. Антиген для реакции агглютинации выбирают в зависимости от вида животного, а именно: сыворотки от крупного рогатого скота исследуют с антигенами *S. enteritidis (dublin)* и *S. typhimurium*, от свиней — *S. typhisuis* или *S. choleraesuis* и *S. typhimurium* и т. д.

Для постановки реакции агглютинации готовят двукратное разведение исследуемых сывороток карбололизированным (0,5%-м) физиологическим раствором, начиная с разведения 1:25 и до 1:3200. Сыворотку берут по 0,5 мл каждого разведения.

При массовых исследованиях допускают постановку реакции в четырех разведениях (1:50, 1:100, 1:200, 1:400) с последующей проверкой положительных проб в разведениях сыворотки до 1:3200.

Одновременно ставят контроли: 1) с негативной сывороткой в тех же разведениях, что и исследуемые сыворотки; 2) с положительными сыворотками до их предельного титра; 3) антиген с физиологическим раствором без сыворотки.

В пробирки вносят по 0,5 мл соответствующего разведения сыворотки. Затем во все пробирки (в том числе и контрольные) добавляют по 0,5 мл антигена при концентрации клеток $5 \cdot 10^8$ /мл. Штатив с пробирками тщательно встряхивают до получения равномерной суспензии и выдерживают в термостате при 37...38 °С 4...10 ч, затем оставляют при комнатной температуре на 14...20 ч, после чего проводят макроскопический учет реакции.

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации в разведениях сыворотки 1:200 и выше, при отрицательных результатах реакции агглютинации — в контрольных пробирках. Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации в разведении сыворотки 1:100 и ниже. При получении сомнительной реакции сыворотку крови от этих животных исследуют повторно через 10...15 дней, и в случаях, если титр не повысился, реакцию следует считать отрицательной. Оценивают реакцию агглютинации в крестах.

Возбудитель сальмонеллеза телят — *S. enteritidis (dublin)* может обуславливать гастроэнтерит у человека вследствие пищевой токсикоинфекции. По антигенной структуре относится к группе D1. Патогенен для белых мышей. Реже сальмонеллез телят может быть обусловлен *S. typhimurium*, который вызывает сальмонеллез у водоплавающей птицы и у человека. По антигенной структуре входит в группу В.

Возбудители сальмонеллеза поросят — *S. typhisuis (kunzendorf)* или *S. choleraesuis (suipestifer)* помимо заболеваний у свиней могут служить причиной пищевой токсикоинфекции у людей. По О-антигену отнесен к группе С1. Реже вызывает сальмонеллез *S. typhimurium* и *S. dublin*.

Возбудитель сальмонеллезного аборта кобыл — *S. abortusequi* (открыт в 1893 г.). Поголовье лошадей (в неблагополучном хозяйстве) обследуют серологически (РА). Фекалии исследуют для выявления бактерионосителей. Показателем развития инфекционного процесса у взрослых лошадей служит титр сыворотки в РА выше 1:400. *S. abortusequi* по О-антигену входит в группу В. В случае невыделения данной культуры из исследуемого материала целесообразно проверить материал на наличие бактериофага *S. abortusequi*.

Возбудитель сальмонеллеза овец — *S. abortusovis*. По О-антигену отнесен к группе В. Реже сальмонеллез овец вызывают *S. typhimurium*, *S. anatum*.

Возбудитель сальмонеллеза птиц — *S. pullorum (S. gallinarum)*. По антигену отнесен к группе D1. Сальмонеллез (пуллороз) протекает остро, в септической форме с большим процентом гибели цыплят (и эмбрионов) — до 100 % в первые недели жизни. У взрослой птицы пуллороз протекает чаще бессимптомно. Взрослое поголовье птицы обследуют серологическим методом кровянокапельной РА с пуллорозным эритроцитарным антигеном. Саль-

монеллез у птиц могут вызывать *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*, *S. infantis* и др.

Возбудитель сальмонеллеза водоплавающей птицы — *S. typhimurium* (наиболее часто), реже *S. anatum* и др. Болеют утята и гусята, реже цыплята. У утят и гусят сальмонеллез протекает остро в 6...20-дневном возрасте, птицы старше 2,5-месячного возраста болеют хронически, взрослые — латентно.

Возбудитель сальмонеллеза пушных зверей — *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*. Болеют серебристо-черные лисицы, песцы, нутрии, реже норки, еноты, соболи и речные бобры. Болезнь протекает остро, с высокой лихорадкой, энтеритом, истощением. У беременных животных наблюдают мертворождение или рождение нежизнеспособных щенков.

Биопрепараты. Концентрированную формолквасцовую вакцину против паратифа (сальмонеллеза) телят готовят из селекционированного штамма *S. dublin*.

Вакцину против паратифа (сальмонеллеза) поросят готовят из трех штаммов в соотношении: *S. choleraesuis* — 50 %, *S. typhimurium* — 25 %, *S. dublin* — 25 %. Активность вакцины проверяют на голубях.

Ассоциированную (поливалентную) вакцину против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят готовят из штамма *S. choleraesuis*, четырех штаммов *P. multocida* и четырех штаммов диплококка. Иммуногенные свойства вакцины проверяют на голубях и белых мышках.

Формолтиомерсальная вакцина против колибактериоза и паратифа пушных зверей, птиц, телят и поросят представляет собой инактивированную формалином и тиомерсалом суспензию эшерихий и сальмонелл. В качестве адьюванта применяют алюмокалиевые квасцы и хлорид кальция.

Сухую живую вакцину против паратифа свиней из штамма ТС-177 готовят из аттенуированного штамма *S. choleraesuis* ТС-177, зависящего по тиамину, с пониженной вирулентностью для белых мышей и морских свинок. Вакцину проверяют на чистоту роста, безвредность на белых мышках и морских свинках.

Вакцина против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма *S. dublin* № 6.

Вакцина живая сухая против сальмонеллеза водоплавающей птицы.

Вакцина против сальмонеллеза свиней из супрессорного ревертанта.

Вакцина формолтиомерсальная поливалентная против сальмонеллеза овец.

Поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа и колибактериоза телят, ягнят, овец и птиц получают из крови волов-продуцентов, иммунизированных поливалентным антигеном, состоящим из 30 штаммов, 24 серогрупп эшерихий и

3 серотипов сальмонелл: *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*. Сыворотку контролируют на стерильность, безвредность и активность.

Поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа телят, поросят, ягнят, овец и птиц получают из крови волов-продуцентов, иммунизированных поливалентным антигеном, состоящим из четырех серотипов сальмонелл: *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, *S. choleraesuis*. Сыворотку проверяют на стерильность, безвредность и активность.

Бактериофаг против паратифа и колибактериоза телят и бактериофаг против пуллороза (тифа птиц) готовят из фагов, выделенных от переболевших сальмонеллезом или колибактериозом животных. В реактор в МПБ или бульон Хоттингера засевают суспензию бактерий и добавляют маточные фаги. Визуально определяют полноту лизиса бактерий, затем добавляют хинозол и фенол. Фаголизат фильтруют через стерилизующие пластинки. Проверяют на стерильность, безвредность и активность (по Аппельману).

Сальмонеллезный антиген для серологической диагностики представляет собой гомогенную инактивированную суспензию сальмонелл (концентрация клеток $1 \cdot 10^9$ /мл). Применяют для серологической диагностики сальмонеллезов в пробирочной РА.

Пуллорозный эритроцитарный антиген представляет собой 10%-ю суспензию эритроцитов барана, сенсibilизированных полисахаридно-полипептидной фракцией *S. gallinarum-pullorum*. Применяют для прижизненной диагностики сальмонеллеза птиц реакцией непрямой гемагглютинации на стекле с каплей крови.

Цветной антиген для диагностики пуллороза птиц представляет собой гомогенную суспензию сальмонелл, убитых формалином и окрашенных кристаллвиолетом. Применяют в кровяной реакции агглютинации на стекле для прижизненной диагностики сальмонеллеза птиц.

Флуоресцирующие сальмонеллезы О-сыворотки получают из крови кроликов, иммунизированных формализованными антигенами. Сыворотки адсорбируют, осаждают сульфатом аммония глобулины и проводят люминесцентное мечение очищенных глобулинов флуоресцеинизотиоцианатом. Выпускают сыворотки к сальмонеллам 5 серогрупп и комплексную сыворотку.

Наборы сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих предназначены для экспресс-диагностики в РА на предметном стекле 33 групп сальмонелл, выделяемых от животных, из продуктов животного происхождения и объектов внешней среды.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства бактерий из предварительно сделанных посевов на дифференциально-диагностических средах и МПА.

2. Приготовить мазки из колоний, окрасить их по Граму, сделать пересев из колоний на среду Ресселя или Олькеницкого.

3. С готовой чистой культурой сальмонелл поставить РА на стекле с О-комплексными и монорецепторными О- и Н-агглютинирующими сыворотками.

4. Учесть биохимические свойства сальмонелл на ПБДЭ.

Контрольные вопросы

1. Какие дифференциально-диагностические среды используют для культивирования сальмонелл?
2. Каков характер роста колоний сальмонелл на среде Эндо?
3. Какой материал направляют в лабораторию при подозрении на сальмонеллез телят, поросят и птиц?
4. Какое количество сероваров входит в род *Salmonella*?
5. Какие антигены входят в состав сальмонелл?

Тема 31

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ ВЕРБЛЮДОВ И ЧЕЛОВЕКА, ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Изучить свойства возбудителей и схемы лабораторной диагностики зооантропонозной чумы и псевдотуберкулеза.

Оборудование и материалы. Культуры *Y. pestis* (вакцинный штамм) *Y. pseudotuberculosis* на МПА и в МПБ, готовые мазки из культуры *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Чума верблюдов и человека. Природно-очаговая болезнь. В естественных условиях резервуаром возбудителя служат грызуны. Здоровых животных заражают переносчики, в первую очередь блохи. Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны верблюды. Болезнь характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением лимфатической системы, легких, тенденцией к септицемии.

Возбудитель чумы верблюдов и человека — бактерия *Y. pestis*, род *Yersinia*, семейство Enterobacteriaceae.

Лабораторная диагностика чумы верблюдов и человека основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. В лабораторию направляют органы, трупы грызунов, гной из бубонов, мокроту, кровь. Работа с чумным материалом разрешена только в специализированных лабораториях.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму. В препаратах возбудитель обнаруживают в форме овоидной или палочковидной клетки размером $(0,3...0,5) \times (1...3)$ мкм; располагается одиночно, парами, иногда короткими цепочками. Клетки грамтрицательные, часто с bipolarной окраской, без жгутиков, спор не образуют (рис. 97).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум $28...29^\circ\text{C}$ (диапазон $14...42^\circ\text{C}$), pH $7,2...7,4$, хорошо растет на обычных питательных средах.

Через 24 ч инкубирования при 37°C на плотных средах образует шероховатые, с фестончатым краем и желтовато-коричневым выпуклым центром колонии, напоминающие из-за прозрачного фестончатого края «кружевной платок» (рис. 98). В МПБ возбудитель образует пленку на поверхности среды, от которой спускаются нити, напоминающие сталактиты, на дне пробирки хлопьевидный осадок.

Возбудитель расщепляет глюкозу, мальтозу, маннит, галактозу, арабинозу, ксилозу до кислоты, желатину не разжижает, индол не образует, выделяет каталазу.

При исследовании материала от грызунов необходимо дифференцировать от *Y. pseudotuberculosis*, который в отличие от *Y. pestis* образует уреазу и ферментирует рамнозу.

Помимо традиционного хода исследования применяют ускоренные методы обнаружения возбудителя и его

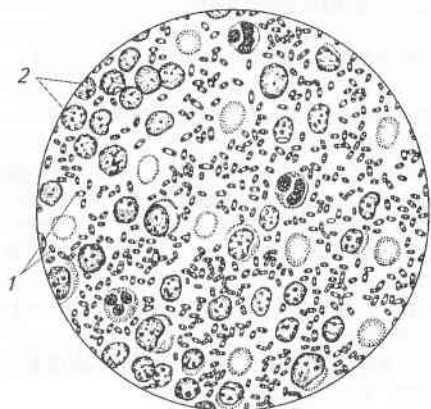


Рис. 97. *Y. pestis* в гное:

1 — клетки возбудителя; 2 — лейкоциты

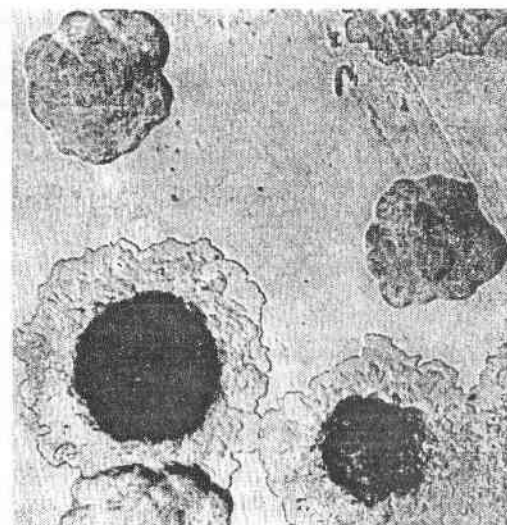


Рис. 98. Колонии *Y. pestis* ($\times 20$)

антигенов в исследуемом материале: иммунофлуоресценцию, реакцию торможения пассивной гемагглютинации (РТГА), реакцию нарастания титра фага, РДП и др.

Биопроба. Метод применяют для выделения чистой культуры из материала, контаминированного посторонней микрофлорой. Для этого используют морских свинок, которым материал вводят подкожно. Не загрязненный другими бактериями материал вводят внутрибрюшинно. Загнивший нативный материал втирают морским свинкам в предварительно выбритый участок кожи на животе. После гибели животных (на третий-седьмой день) проводят вскрытие с последующим бактериологическим исследованием внутренних органов.

Биопрепараты. Чумная живая сухая вакцина из штамма EV.

Химическая чумная вакцина.

Чумной бактериофаг.

Псевдотуберкулез (родентиоз). Инфекционная болезнь, преимущественно грызунов и птиц, характеризуется узелковым поражением паренхиматозных органов, сходным с изменениями при туберкулезе.

Возбудитель псевдотуберкулеза — бактерия *Y. pseudotuberculosis*, род *Yersinia*, семейство Enterobacteriaceae.

Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале (прежде всего методом биопробы), выделение чистой культуры посевом на питательные среды и биопробой, идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют паренхиматозные органы, лимфатические узлы, трупы грызунов и птиц.

Микроскопия препаратов из исходного материала. По морфологии и тинкториальным свойствам *Y. pseudotuberculosis* практически неотличим от *Y. pestis*.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *Y. pseudotuberculosis* — факультативный анаэроб, температурный оптимум 28...30 °С, рН 7,2...7,4. Свойства возбудителя варьируют в зависимости от температурного режима культивирования. К питательным средам нетребователен.

На плотных средах при 22...28 °С через 24 ч образует мелкие (диаметр 0,1...0,5 мм) круглые, выпуклые, прозрачные, серовато-желтоватые, блестящие колонии с приподнятым центром. При 37 °С может проявляться полиморфизм колоний, связанный с формированием *R*-колоний, выпуклых, с коричневатым центром и волокнистыми истонченными краями. При низких температурах (22 °С и ниже) образует жгутики, чем отличается от *Y. pestis*, при 37 °С неподвижен. В МПБ растет с равномерным помутнением среды и последующим выпадением хлопьевидного или вязкого осадка.

С целью видовой идентификации исследуют ферментативные свойства. *Y. pseudotuberculosis* образует уреазу, расщепляет рамнозу, мелибиозу, не обладает лизин-орнитиндекарбоксилазами, не гидролизует желатин, не образует индол, не утилизирует цитрат Симмонса и не дает реакцию Фогес—Проскауера при 25 °С.

Для серовариантной идентификации выделенных культур возбудителя применяют серологические реакции. *Y. pseudotuberculosis* подразделяют на шесть серологических групп (I...VI) по термостабильным антигенам и пять вариантов — по жгутиковым антигенам.

Биопроба. Тканевым гомогенатом или выделенной культурой заражают подкожно или внутрибрюшинно белых мышей, морских свинок, кроликов. Мыши погибают через 2...4 дня, морские свинки и кролики — через 2...35 дней в зависимости от вирулентности культуры. Из органов павших подопытных животных делают посевы на питательные среды для выделения культуры возбудителя, готовят и микроскопируют окрашенные мазки и отпечатки.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Описать характер роста *Y. septis* и *Y. pseudotuberculosis* на МПА и в МПБ.

2. Промикроскопировать мазки из культур *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

3. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Каковы основные морфологические признаки чумных бактерий?

2. Какие тесты используют для дифференциации возбудителей чумы от бактерий псевдотуберкулеза?

3. В чем заключаются особенности биопробы при чуме?

4. При какой температуре можно культивировать возбудителей чумы и псевдотуберкулеза?

5. Какие животные наиболее восприимчивы к псевдотуберкулезу?

Тема 32

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА, ТУЛЯРЕМИИ, БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятий. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей и лабораторной диагностикой бруцеллеза и туляремии, а также биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Единый бруцеллезный антиген, антиген для кольцевой реакции с молоком, роз-бенгал антиген, позитивная бруцеллезная сыворотка, негативная сыворотка, физиологический раствор, содержащий 0,5 % фенола, серологические пробирки, штативы, мерные пипетки, красители для окраски по Граму, Козловскому (Стампу), пробы молока.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Бруцеллез. Это хроническая инфекционная болезнь, проявляющаяся абортными, задержанием последа, эндометритами и расстройством воспроизводительной функции животных. Восприимчивы многие виды сельскохозяйственных животных и человек.

Возбудитель — бактерии рода *Brucella*: *B. melitensis* (три биовара) — основной хозяин овцы и козы; *B. abortus* (девять биоваров) — основной хозяин крупный рогатый скот; *B. suis* (четыре биовара) — основной хозяин свиньи, а также северные олени и зайцы; *B. ovis* — основной хозяин овцы; *B. neotomae* — основной хозяин древесные крысы; *B. canis* — основной хозяин собаки.

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологических и серологических исследований.

Бактериологическое исследование в основном применяют при первичной постановке диагноза на бруцеллез в ранее благополучных хозяйствах.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы крови (сыворотки) для серологических исследований, абортирванный плод с плодными оболочками, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей или желудок плода, кусочки печени, селезенки, пробы молока (последние порции). При убое животных берут паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов — семенники. Объектом исследования могут быть молочные продукты (брынза, сыр, масло и др.), объекты внешней среды.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и др.). Бруцеллы — грамотрицательные короткие палочковидные или кокковидные бактерии размером 0,5...1,5 мкм, без жгутиков, спор не образуют, формируют микрокапсулу. В окрашенном препарате располагаются одиночно, реже парами, короткими цепочками.

Окраска по методу Козловского: препарат окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 2 мин, промывают водой, докрасивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 1 мин, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые.

Окраска по методу Стампа: фиксированный на пламени мазок окрашивают фуксином Пфейффера 10 мин, промывают водой, обрабатывают 0,5%-м водным раствором уксусной кислоты 30 с, затем препарат промывают водой и докрасивают 1%-м водным раствором метиленового синего 20...30 с. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, другие бактерии синие.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Бруцеллы — аэробы, микроаэрофилы, температурный оптимум 37...38 °С, рН 6,8...7,2. Материал засевают на специальные питательные среды: мясо-пептонный агар и бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый агар и бульон, картофельный агар, эритрит-агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Печеночные среды включают в себя отвар печени. Картофельный агар готовят на отваре картофеля, глюкозу и глицерин добавляют в среды соответственно в количестве 1 % и 2...3 %. Эритрит-агар содержит вещество (эритрит), стимулирующее рост бруцелл. В состав сывороточно-декстрозного агара помимо обычной питательной основы входит 10 % сыворотки крови и 1 % декстрозы.

Некоторые виды бруцелл растут при повышенном содержании в атмосфере оксида углерода (IV) (*B. abortus*, *B. ovis*). Так как неизвестно, каким видом бруцелл заражен исследуемый материал, половину посевов инкубируют в обычной атмосфере, другую — в атмосфере, содержащей 10...15 % оксида углерода (IV).

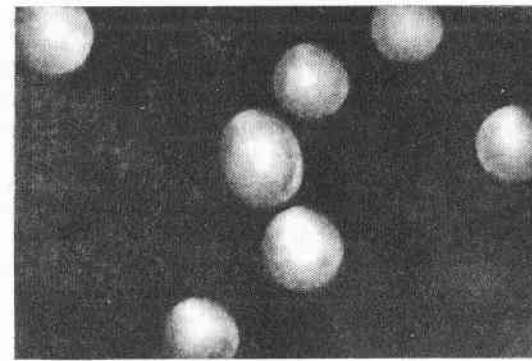


Рис. 99. Колония бруцелл (×20)

Посевы культивируют в течение 30 сут, периодически просматривая. Рост бруцелл чаще появляется на 7...10-е сутки, иногда позже.

На плотных средах возбудитель формирует мелкие, прозрачные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком колонии (*S*-форма), возможно появление шероховатых колоний (*R*-форма) (рис. 99, 100). По мере старения колонии мутнеют и за счет пигментообразования могут темнеть. На жидких питательных средах рост бруцелл проявляется равномерным помутнением среды, образованием голубоватого пристеночного кольца, позднее формируется небольшой осадок.

У выросших культур изучают морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по методам Грама, Козловского.

Культуру идентифицируют серологически в РА на стекле с положительной бруцеллезной сывороткой, разведенной в соотношении 1:50. Виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* антигенно родственны, поэтому их клетки агглютинируют в стандартной бруцеллезной сыворотке. Для идентификации *B. ovis* кроликов иммунизируют выделенной культурой и затем кроличью сыворотку исследуют в РДСК со стандартным овисным антиге-

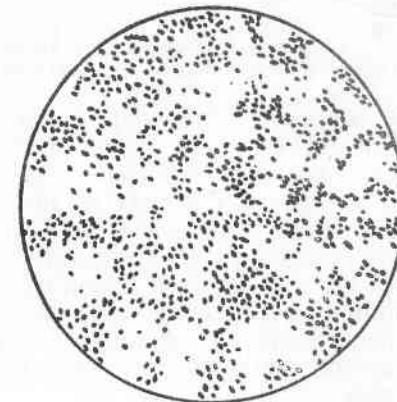


Рис. 100. Бруцеллы в чистой культуре

ном (*B. ovis*) — должна быть четкая положительная реакция, если это культура *B. ovis*.

Для определения видовой принадлежности у выделенных культур бруцелл изучают потребность в оксиде углерода (IV), образование сероводорода, способность к росту на питательных средах с тионином и фуксином, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, ферментацию аминокислот, углеводов, а также агглютинабельность с моноспецифическими сыворотками против отдельных клеточных антигенов бруцелл (А, М, R). Некоторые из дифференцирующих характеристик приведены в таблице 30.

30. Дифференцирующие признаки видов и биоваров бруцелл

| Вид бруцелл | Биовар | Потребность в оксиде углерода (IV) | Выделение сероводорода | Рост на средах с красками | | Агглютинация моноспецифическими сыворотками | | |
|----------------------|--------|------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------|---|---|---|
| | | | | тионин | фуксин | А | М | Р |
| <i>B. melitensis</i> | 1 | — | — | + | + | — | + | — |
| | 2 | — | — | + | + | + | — | — |
| | 3 | — | — | + | + | + | + | — |
| <i>B. abortus</i> | 1 | x* | + | — | + | + | — | — |
| | 2 | x | + | — | — | + | — | — |
| | 3 | x | + | + | + | + | — | — |
| | 4 | x | + | — | + | — | + | — |
| | 5 | — | — | + | + | — | + | — |
| | 6 | — | x | + | + | + | — | — |
| | 7 | — | x | + | + | + | + | — |
| | 8 | + | x | — | + | — | + | — |
| | 9 | — | + | + | + | — | + | — |
| <i>B. suis</i> | 1 | — | + | + | x | + | — | — |
| | 2 | — | — | + | — | + | — | — |
| | 3 | — | — | + | + | + | — | — |
| | 4 | — | — | + | x | + | + | — |
| <i>B. ovis</i> | | + | — | + | x | — | — | + |
| <i>B. neotomae</i> | | — | + | — | — | + | — | — |
| <i>B. canis</i> | | — | — | + | x | — | — | + |

* x — признак варьирующий, 11...89 % штаммов дают положительные реакции. Тионин и основной фуксин взяты в концентрации 1 : 50 000 (масса/объем).

Биопроба. Это эффективный метод обнаружения бруцелл в исследуемом материале, особенно загрязненном. Морских свинок перед заражением исследуют в РА, в опыт берут животных, в сыворотке которых не обнаружены антитела к возбудителю. Тканевый материал в виде суспензии (1 : 10) в объеме 1 мл вводят подкожно. О результате биопробы судят по данным исследования сыворотки крови на 15, 25 и 40-й день после заражения (животные не погибают). Появление антител в титре 1 : 10 и более оценивают как положительный результат. Реагирующих животных убивают и подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика: при массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, розбенгал пробу (РА на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР).

Пробирочная РА. Реакцию ставят в объеме 1 мл. Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, собак, пушных зверей, верблюдов разводят физиологическим раствором, содержащим 0,5 % фенола; сыворотки крови овец коз, буйволов разводят 5%-м, а сыворотки оленей — 10%-м фенолизированным физиологическим раствором. Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов исследуют в разведениях от 1 : 50 до 1 : 400; овец, коз, свиней, буйволов, оленей, собак — в разведениях 1 : 25 и более; пушных зверей — 1 : 10 и более. При массовых исследованиях сыворотки крови исследуют в двух первых разведениях. После приготовления разведений сыворотки в объеме 0,5 мл в каждую пробу добавляют 0,5 мл разведенного до концентрации клеток $5 \cdot 10^8$ /мл единого бруцеллезного антигена (при этом разведения удваиваются), компоненты перемешивают встряхиванием, штатив с пробирками помещают в термостат при 37...38 °С на 18...20 ч, затем оставляют на несколько часов при комнатной температуре. Результат учитывают по общепринятой системе (см. тему 15). В качестве контролей параллельно исследуют заведомо положительную и отрицательную сыворотки.

РА при бруцеллезе крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов считают положительной, если титр составляет 1 : 100 и более (1 : 50 — сомнительный результат), у овец, коз, оленей, буйволов и собак — 1 : 50 (1 : 25 — сомнительный результат). При получении сомнительных реакций сыворотки крови от этих животных исследуют повторно через три-четыре недели. В ходе массовых серологических исследований практикуют исследование сывороток в двух первых разведениях. При этом необходимо учитывать, что некоторые сыворотки, не агглютинирующие антиген в малых разведениях, в более высоких разведениях дают положительный результат — этот так называемый феномен «прозоны», который может служить причиной ложных отрицательных результатов.

В разных странах для пробирочной РА готовят антигены, различающиеся по агглютинабельности, что делает несопоставимыми титры, полученные при исследованиях. Поэтому рекомендовано выражать результат пробирочной РА в международных единицах (МЕ). Для этого предложена международная стандартная бруцеллезная сыворотка, по отношению к которой и определяют активность национальных антигенов. Активность этой сыворотки установлена в 1000 МЕ. Например, с каким-то национальным антигеном международная сыворотка в пробирочной РА показывает титр 1 : 500, значит, если с этим антигеном какая-либо другая сыворотка дает титр РА 1 : 500, то она содержит 1000 МЕ,

если вторая исследуемая сыворотка показывает титр 1 : 400, то ее активность в международных единицах составит $1000 \cdot 400/500 = 800$ МЕ и т.д. В каждой стране разработана национальная бруцеллезная стандартная сыворотка, соответствующая по активности международной. По указанным критериям положительные титры РА на бруцеллез для крупного рогатого скота составляют 100 МЕ (50 МЕ — сомнительный результат), для овец, коз, буйволов, оленей и собак — 50 МЕ (25 МЕ — сомнительный результат).

Роз-бенгал проба (РБП). В отличие от пробирочной РА данная серологическая реакция является качественной. С ее помощью в сжатые сроки исследуют большое количество животных. Сыворотки, давшие положительную РБП, дополнительно исследуют в пробирочной РА и РСК. Техника постановки РБП изложена в теме 15. В РБП исследуют неразведенную сыворотку крови, влияние нормальных антител на специфичность реакции нивелируется использованием антигена с кислыми значениями рН, при которых нормальные антитела с низкой avidностью не реагируют с антигеном, что обеспечивает достаточно высокую специфичность РБП.

РСК. Реакцию ставят в объеме 1 мл. Предварительно инактивированные в течение 30 мин сыворотки крови (лошадей при 56...58 °С, крупного рогатого скота при 60...62 °С, свиней при 60...62 °С, овец и коз при 58...60 °С) исследуют в разведении 1 : 5...1 : 10. Положительным результатом РСК (РДСК) считают задержку гемолиза на два креста и более в разведении сыворотки крови 1 : 5.

Кольцевая реакция с молоком (КР). Метод применяют для ориентировочной проверки благополучных по бруцеллезу молочных стад и для контроля молока на рынке.

В бактериологическую пробирку наливают 2 мл исследуемого молока, добавляют 0,1 мл антигена — клетки бруцелл, окрашенные гематоксилином. Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37...38 °С на 45...50 мин, после чего учитывают результат. Положительный результат — верхняя часть столбика молока (сливки) синего цвета, остальное молоко белое или слегка синеватое. Отрицательный результат — слой сливок белый, молоко равномерно окрашено в синий цвет. Сомнительный результат — сливки слабо окрашены в синий цвет, молоко синего цвета.

Аллергическая диагностика не принадлежит к лабораторным методам; ее применяют непосредственно в хозяйствах. При бруцеллезе развивается состояние гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которое может сопровождаться синтезом антител, улавливаемых в серологических реакциях, но иногда ГЗТ отмечают при отрицательных показаниях серологических тестов. Для обнаружения ГЗТ у животных используют диагностический аллерген — бруцеллин (см. тему 20).

Биопрепараты. Вакцина из штамма *B. abortus* № 19. Это наиболее изученная вакцина. Вакцинный штамм выращивают на плотных питательных средах. Устанавливают концентрацию микробных клеток $8 \cdot 10^{10}$ /мл, лиофильно высушивают. Готовый препарат контролируют на чистоту роста, диссоциацию, безвредность на морских свинках и белых мышах, одновременно у морских свинок проверяют наличие серологического ответа на введенные вакцины. Иммуногенность препарата контролируют на морских свинках.

Живая сухая вакцина против бруцеллеза из слабоагглютинирующего штамма № 82 отличается от вакцины из штамма № 19 слабым серологическим ответом с быстрым снижением уровня гуморальных антител, что позволяет при помощи серологических реакций дифференцировать вакцинированных животных.

Единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК получают следующим образом: культуру вакцинного штамма № 19 выращивают на плотной питательной среде, бактериальную массу инактивируют, проверяют на чистоту и стерильность путем микроскопии и высева на питательные среды. Контролируют на специфичность с физиологическим раствором и негативной сывороткой. Активность проверяют в РА и РСК с национальной стандартной бруцеллезной агглютинирующей сывороткой.

Антиген для кольцевой реакции с молоком. Микробную массу культуры *B. abortus* (штамм № 19) готовят, как для единого бруцеллезного антигена, инактивируют, устанавливают необходимую концентрацию микробных клеток, протравливают сульфатом железа, окрашивают в синий цвет гематоксилином, контролируют на стерильность, специфичность и активность (см. тему 20).

Роз-бенгал антиген представляет собой суспензию бруцелл в буферном растворе (рН 3,6), инактивированных нагреванием и фенолом, окрашенных бенгальским розовым в малиново-розовый цвет. Антиген контролируют на стерильность, чистоту, рН. Специфичность проверяют с физиологическим раствором и негативными сыворотками, активность — методом титрования с национальной стандартной сывороткой.

Флуоресцирующую бруцеллезную сыворотку готовят из позитивной бруцеллезной сыворотки, глобулины которой метят флуоресцеинизотиоцианатом.

Позитивную бруцеллезную сыворотку получают гипериммунизацией животных-продуцентов. Используют для контроля при постановке серологических реакций (РА, РСК и др.), а также серологической идентификации бруцелл.

Диагностический аллерген-бруцеллин представляет собой стерильную, прозрачную, желтоватого цвета жидкость, содержащую продукты жизнедеятельности бруцелл и вещества, извле-

ценные из них. Бактериальную массу выращивают (штамм *B. abortus* В-1) на агаровой среде, прогревают при 105...110 °С 1 ч, центрифугируют, надосадочную жидкость стерилизуют фильтрованием, бактериальную массу ресуспендируют в физиологическом растворе. Процедуру нагревания, центрифугирования и стерилизации повторяют, после чего оба фильтрата объединяют. Полученный препарат контролируют, как описано ранее (см. тему 20).

Туляремия. Острая инфекционная болезнь. У сельскохозяйственных животных обычно протекает в септической форме. Характеризуется увеличением лимфатических узлов, симптомами поражения нервной системы, у крупного рогатого скота может проявляться маститами, у лошадей — абортами. Из сельскохозяйственных животных к возбудителю туляремии наиболее чувствительны поросята, ягнята, из диких животных — грызуны. Восприимчив человек.

Возбудитель туляремии — бактерия *Francisella tularensis* (принадлежит к роду *Francisella*). Подразделяют на два биовара: *F. tularensis* sb. *tularensis* и *F. tularensis* sb. *palaeartica*. Для вида *F. novicida* характерна незначительная вирулентность.

Лабораторная диагностика туляремии основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры методом биопробы и посевом на питательные среды; идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим свойствам.

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют мочу, фекалии, абортрованный плод; для посмертной — печень, почки, селезенку, увеличенные лимфатические узлы; трупы мелких животных, грызунов — целиком. При необходимости материал консервируют глицерином.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму и Романовскому—Гимзе. *F. tularensis* — мелкая [(0,3...0,7) × (0,2...0,4) мкм] грамотрицательная палочковидная бактерия, преимущественно в форме коккобактерии. Красители воспринимает плохо, без жгутиков, спор не образует, но формирует капсулу (рис. 101). Из-за мелких размеров возбудителя его микроскопическое обнаружение затруднительно.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель туляремии — строгий аэроб, не растет на общепринятых средах, температурный оптимум 36...37 °С, рН 6,7...7,4. Исследуемый материал высевают на среду Френсиса, кровяную среду Емельяновой или желточную Мак—Коя (см. тему 7).

Среда Френсиса: к МПА (рН 7,3) добавляют 0,1 % цистина, 1 % глюкозы, кипятят несколько минут, охлаждают до 50 °С, добавляют 10 % дефибрированной стерильной крови кролика.

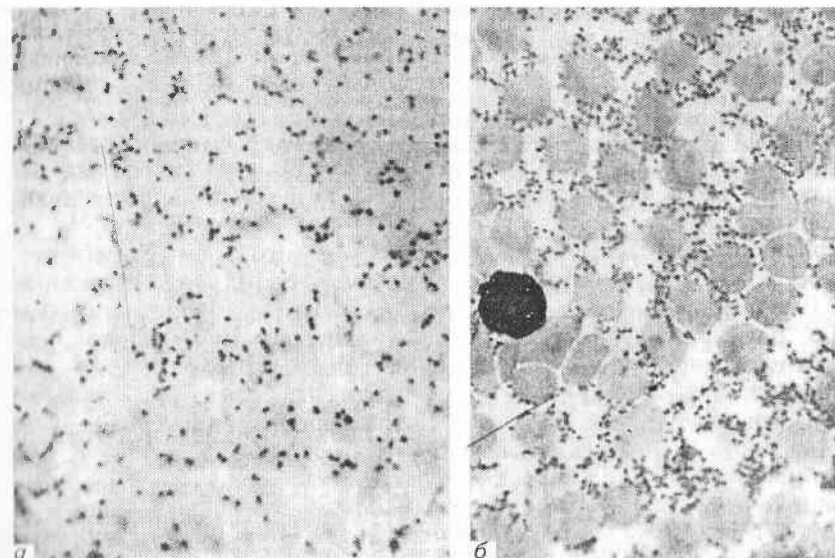


Рис. 101. *F. tularensis*:

а — в чистой культуре (×1000); б — в крови животного (×800)

Среда Емельяновой: в рыбно-дрожжевой агар вносят 0,1 % цистина, 1 % глюкозы, агар охлаждают до 45 °С и добавляют 10 % стерильной дефибрированной крови.

Посевы культивируют 24...48 ч. Возбудитель формирует мелкие, круглые, выпуклые, с ровными краями, гладкой блестящей поверхностью, беловатые колонии (рис. 102). Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают, микроскопируют. В препаратах из культуры в отличие от препаратов из нативного материала клетки возбудителя в основном не кокковидной, а палочковидной формы.

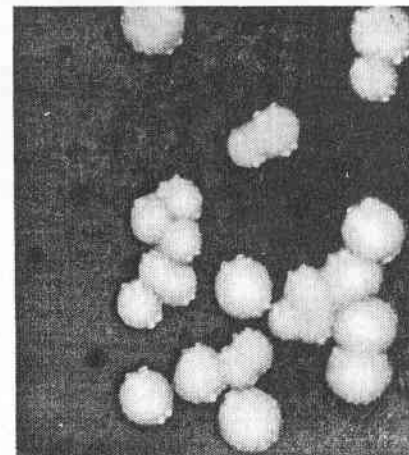


Рис. 102. Колонии *F. tularensis* (×7)

У культур с типичными для *F. tularensis* культурально-морфологическими признаками исследуют ферментативные свойства (табл. 31).

31. Дифференциальные признаки видов и биоваров рода *Francisella*

| Признак | <i>F. tularensis</i> | | <i>F. novicida</i> |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------|
| | биовар <i>tularensis</i> | биовар <i>palaeartica</i> | |
| Рост на простых средах | — | — | + |
| Потребность в цистине или цистеине | + | + | — |
| Формирование капсул | + | + | — |
| Образование кислоты из: | | | |
| мальтозы | + | ± | — |
| сахарозы | — | — | + |
| глицерина | — | ± | + |
| Летальная доза менее 1000 клеток для кролика при подкожном введении | + | — | — |

Выделенную культуру дополнительно идентифицируют с туляремийной иммунной сывороткой в серологических реакциях (РА, ИФА, РП, РНГА).

Биопроба. Выделить культуру *F. tularensis* посевом на питательные среды удастся не всегда. Более эффективен метод заражения белых мышей или морских свинок тканевой суспензией подкожно или внутрибрюшинно по 0,5 мл. Практикуют проведение 2...3 «слепых» пассажей на чувствительных лабораторных животных. Зараженные животные погибают на 3...5-е сутки, иногда позднее (8...12-е сутки). У павших животных обнаруживают в паренхиматозных органах некротические очажки. Из органов путем посева на питательные среды выделяют культуру возбудителя.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить и окрасить по методу Грама (Козловского) мазки из инактивированных клеток бруцелл, *F. tularensis*. Описать культуральные и морфологические свойства возбудителей.
2. Исследовать в пробирочной РА и роз-бенгал-тесте сыворотки крови от здоровых и больных бруцеллезом животных (крупный рогатый скот).
3. Освоить технику постановки и учета результатов кольцевой реакции с молоком.
4. Ознакомиться с биопрепаратами для специфической профилактики и диагностики бруцеллеза.

Контрольные вопросы

1. Какой материал направляют в лабораторию для бактериологического исследования на бруцеллез и туляремию?
2. В чем состоит бактериологическое исследование на бруцеллез и туляремию?
3. Как ставят биопробу на бруцеллез и туляремию?
4. Какие методы применяют для серологической диагностики бруцеллеза?
5. Какие выпускают вакцины против бруцеллеза?

Тема 33

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЕЗА, ГЕМОФИЛЕЗНОГО ПОЛИСЕРОЗИТА И АКТИНОБАЦИЛЛЕЗНОЙ ПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятий. Ознакомить студентов с лабораторной диагностикой пастереллеза, гемофилезного полисерозита и актинобациллезной пневмонии свиней, основными свойствами возбудителей, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культуры *P. multocida* в МПБ, на МПА, демонстрация — штативы с тестами, характеризующими видовые ферментативные признаки *P. multocida* (включая биовары), культуры *A. pleuropneumoniae* и *H. parasuis* на кровяном МПА в чашках Петри с феноменом сателлитного роста, трупы мышей, павших после заражения *P. multocida*, пипетки Пастера, красители для окраски по Граму, Гинсу, демонстрация — чашки Петри с феноменом подавления роста культуры *P. multocida* серовара А в присутствии *S. aureus*, пробирки с отрицательной и положительной трипафлавиновой пробой с культурами *P. multocida* сероваров А и D, МПА и МПБ в пробирках.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Пастереллез (геморрагическая септицемия). Инфекционная болезнь многих видов млекопитающих и птиц. При остром течении характеризуется септициемией, при подостром и хроническом — в основном поражением легких.

Возбудитель — *Pasteurella multocida* (включает в себя три подвида), род *Pasteurella*, семейство Pasteurellaceae.

Лабораторная диагностика пастереллеза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на культуральные среды и методом биопробы, идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют селезенку, печень, почку, кровь сердца, лимфатические узлы, пораженные участки лёгких и регионарные лимфатические узлы. При необходимости материал консервируют 30%-м водным раствором глицерина, трубчатую кость заворачивают в марлю, пропитанную 5...10%-м раствором формалина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму и одним из методов для выявления капсулы. Пастереллы представляют собой грамтрицательные короткие палочковидные бактерии размером $(0,3...2) \times (0,2...0,3)$ мкм, без спор и жгутиков, образуют капсулу.

Возбудитель в препарате из материала обнаруживают в форме мелких $(0,3 \times 1,5)$ мкм грамтрицательных коротких палочковидных капсулообразующих бактерий с закругленными концами вплоть до коккобактерий. При окраске синькой Леффлера бактериальные клетки более интенсивно окрашены в концевых частях (биполярная окраска). Клетки располагаются единично, попарно, короткими цепочками (рис. 103).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37°C (диапазон $25...40^\circ\text{C}$), штаммы птиц растут при 42°C , рН 7,2...7,4. Материал засевают на МПА, в МПБ, лучше — на кровяной или сывороточный МПА, так как нередко возбудитель в первичных посевах плохо растет или не растет на простых питательных средах. Посевы инкубируют в течение 24...48 ч, при отсутствии роста — в течение 4...5 сут.

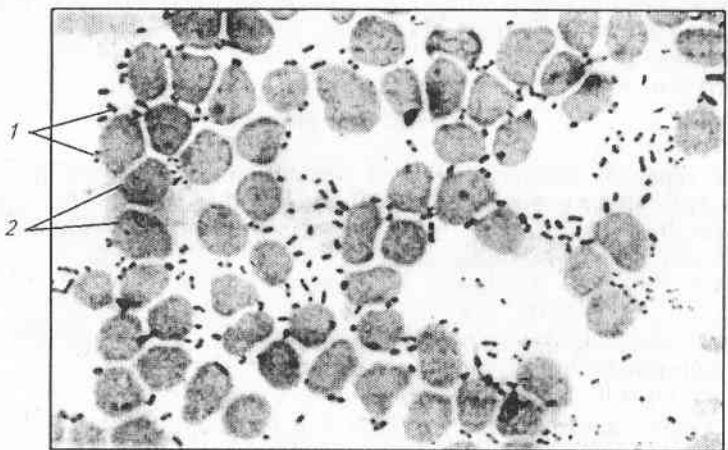


Рис. 103. *P. multocida*:

1 — биполярно окрашенные клетки пастерелл; 2 — форменные элементы крови

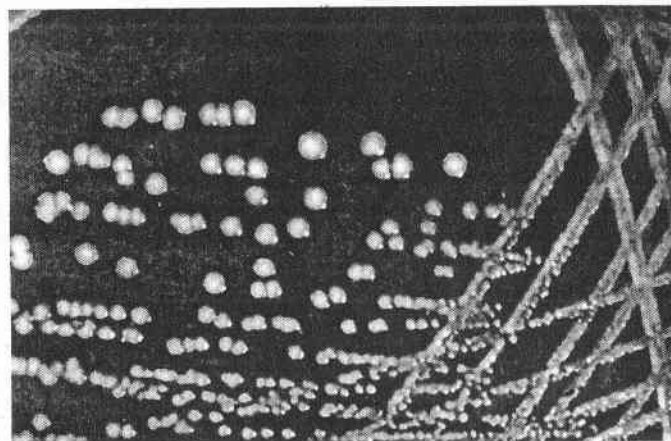


Рис. 104. Колонии *P. multocida* на агаре (S-форма)

На плотных питательных средах пастереллы формируют мелкие, круглые, выпуклые, серо-белые флуоресцирующие в косо проходящем пучке света колонии (S-форма) диаметром 1...3 мм (рис. 104); возможно появление крупных, слизистых (M-форма) или шероховатых (R-форма) колоний. Культуры серовара А образуют крупные (диаметр более 3 мм) слизистые колонии. Гемолитическая активность у *P. multocida* не выражена. В МПБ возбудитель растет с равномерным помутнением среды и образованием на дне пробирки слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде «косички», рост мукоидных штаммов сопровождается более интенсивным помутнением среды. У выделенных культур исследуют морфологию и тинкториальные свойства.

У культур с типичными культурально-морфологическими признаками исследуют ферментативные свойства. *P. multocida* расщепляет маннит, ксилозу, не разлагает мальтозу, образует индол, орнитиндекарбоксилазу, не синтезирует уреазу, не проявляет зависимости от V-ростового фактора ДПН (дифосфопиридиннуклеотид). Внутри вида *P. multocida* дифференцируют по ферментативным особенностям на три подвида: *P. multocida subsp. multocida* ферментирует сорбит и не разлагает дульцит; *P. multocida subsp. septica* не ферментирует сорбит и дульцит; *P. multocida subsp. gallicida* ферментирует сорбит и дульцит.

Серологические свойства изучают для дифференциации культур *P. multocida* по серовариантной принадлежности. Известны четыре серовара *P. multocida* (А, В, D, Е). В Европе эпизоотологическое значение имеют три серовара: В, D, А. Их идентифицируют в РНГА по капсульным антигенам, но чаще по присущим сероварам D и А особенностям химического состава клеток. Для

этого устанавливают присутствие гиалуроновой кислоты в капсульном веществе и склонность бактерий агглютинировать в растворе триафлавина.

Триафлавинная проба: исследуемую культуру выращивают в бульоне Хоттингера (3 мл) в течение 24 ч, центрифугируют, затем удаляют 2,5 мл культуральной жидкости, осадок ресуспендируют и добавляют 0,5 мл водного раствора триафлавина (1:1000). Суспензию бактерий выдерживают при комнатной температуре 10...20 мин. Учет результатов: если суспензия стабильна, культуру относят к сероварам А или В; если сформирован осадок, культуру относят к серовару D.

Тест на гиалуроновую кислоту в составе капсулы: исследуемую культуру засевают «штрихом» на агар Хоттингера в чашках Петри, затем высевают в виде прямой линии по диаметру чашки культуру *S. aureus*, способную продуцировать гиалуронидазу. Посевы инкубируют 18...24 ч, после чего просматривают колонии в косопадающем свете. Культуральные свойства *P. multocida* сероваров В, D, Е вблизи «штриха» *S. aureus* не изменяются, колонии культур серовара А (из-за расщепления гиалуронидазой стафилококка гиалуроновой кислоты в составе капсулы пастерелл) тусклые, серые или голубые, а не флуоресцирующие.

Биопроба. Метод используют для выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и определения вирулентности чистых культур.

Исследуемым материалом от крупного рогатого скота, свиней, овец заражают белых мышей и кроликов; материалом, полученным от птиц, заражают голубей, кур, уток. Кроликов перед биопробой исследуют на пастереллоносительство: в течение трех дней вводят интраназально по две капли 0,5%-го водного раствора бриллиантового зеленого. Появление гнойного истечения из носовой полости указывает на пастереллоносительство, и таких животных из опыта исключают.

Суспензию тканевого материала, разведенную физиологическим раствором (1:10), вводят кроликам подкожно по 0,5 мл, белым мышам подкожно по 0,2 мл, голубям внутримышечно по 0,3 мл. При наличии в материале возбудителя животные погибают через 18...36 ч. Трупы животных подвергают бактериологическому исследованию.

Биопрепараты. Вакцина эмульгированная против пастереллеза крупного рогатого скота представляет собой инактивированные 0,25%-м раствором формальдегида клетки пастерелл серовара В в водно-масляной эмульсии. Контролируют на стерильность, безвредность (белые мыши, кролики) и иммуногенность на кроликах. Кроме того, готовят эмульгированные вакцины против пастереллеза свиней, кроликов, цутрий.

Преципитированная формолвакцина против пастереллеза овец и свиней представляет собой выращенные в реакторе в бу-

льоне Хоттингера культуры пастерелл серовара В, инактивированные формальдегидом, сорбированные алюмокалиевыми квасцами. Контролируют на стерильность, безвредность (белые мыши), иммуногенность на голубях.

Гипериммунную сыворотку против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней получают гипериммунизацией волов. Контролируют на стерильность, безвредность (белые мыши, морские свинки), на специфическую активность на белых мышках, которым её вводят по 0,1; 0,05 и 0,03 мл. Сыворотку признают активной, если при контрольном заражении остаются живыми мыши, привитые первыми двумя дозами препарата.

Полужидкая гидроокисьюалюминиевая формолвакцина против пастереллеза крупного рогатого скота и буйволов представляет собой культуру пастерелл серовара В, выращенную в полужидкой агаровой среде в реакторе, инактивированную формальдегидом и сорбированную на геле гидроксида алюминия. Контролируют так же, как и преципитированную формолвакцину.

Сухие вакцины против пастереллеза птиц из штаммов АВ и К Краснодарской НИВС представляют собой лиофилизированные реакторные культуры вакцинных штаммов АВ и К. Контролируют на чистоту и типичность роста, безвредность и иммуногенность на курах.

Кроме того, выпускают инактивированные вакцины, содержащие три серовара *P. multocida* (А, В, D).

Гемофилезный полисерозит. Септическое заболевание поросят раннего послеродового периода. Характеризуется серозно-фибринозным воспалением плевры, перикарда, брюшины, суставов, иногда отмечают менингоэнцефалит.

— Возбудитель — *Haemophilus parasuis*, род *Haemophilus*, семейство Pasteurellaceae.

Лабораторная диагностика гемофилезного полисерозита основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Материал для исследования. Стерильно отбирают серозно-фибринозный экссудат из перитонеальной, плевральной, перикардальной полостей, пораженных суставов, а также пораженные серозные оболочки.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму и на капсулы бактерий. *H. parasuis* — мелкие тонкие грамотрицательные палочки, без спор и жгутиков, образуют капсулу. Возбудитель обнаруживают в виде полиморфных

грамотрицательных палочек, диплобактерий, коротких цепочек из палочек, а также в виде нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Факультативный анаэроб, температурный оптимум 37...38 °С. Так как возбудитель — ауксотроф по коферменту ДПН, он не растет на обычных питательных средах. Материал засевают на «шоколадный» агар в чашках Петри и кровяной МПА с бактерией-«кормилкой».

«Шоколадный агар»: к расплавленному МПА (рН 7,2...7,4) температурой 80...90 °С добавляют 10 % стерильной дефибрированной крови барана или лошади. Компоненты перемешивают и после охлаждения до 50...80 °С среду разливают по чашкам Петри, пробиркам.

На кровяной МПА (5 % крови барана, кролика, лошади) исследуемый материал засевают шпателем по всей поверхности среды. Затем по диаметру чашки в виде двух прямых линий под углом 90° засевают культуру негемолитического штамма *S. epidermidis* или *E. coli*. Посевы инкубируют при 37...38 °С 24...48 ч в условиях обычной атмосферы.

На «шоколадном» МПА возбудитель формирует мелкие, круглые, прозрачные, с ровными краями и гладкой поверхностью колонии. На кровяном МПА возбудитель растет в виде мельчайших негемолитических колоний только вблизи «штриха» бактерии-«кормилки» на удалении не более 0,5...1,0 см (рис. 105). Такой рост *H. parasuis* называют «сателлитным»; он связан с тем, что бактерия-«кормилка» синтезирует ДПН, который диффундирует в толщу агаровой среды и в этой зоне способен расти ауксотроф *H. parasuis*. «Шоколадный» агар содержит ДПН, выделенный из разрушенных эритроцитов, и поэтому *H. parasuis* растет по всей поверхности питательной среды. Для проверки у культуры бактерий зависимости от ДПН ее дополнительно высевают на сывороточный «шоколадный» агар. Культуры возбудителя растут на «шоколадном» и не растут на сывороточном МПА, поскольку в последнем отсутствует ДПН.

Из подозрительных колоний на «шоколадном» агаре или «сателлитных» колоний на кровяном агаре готовят мазки, окрашивают по Граму, на капсулы по методу Гинса, определяют

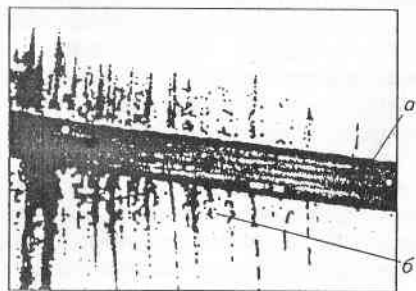


Рис. 105. Рост сателлитных колоний гемофильных бактерий:

а — «штрих» бактерии-«кормилки»; б — мелкие сателлитные колонии гемофильных бактерий

наличие жгутиков в препарате «раздавленная капля»: *H. parasuis* неподвижен.

У культур исследуют уреазную активность посевом на среду Заксе: раствор А: 96%-й этанол — 2 мл и дистиллированная вода — 4 мл; раствор Б: дистиллированная вода — 100 мл, дигидрофосфат калия — 0,1 г, гидрофосфат калия — 0,12 г, хлорид натрия — 0,5 г, добавляют 1 мл 2%-го раствора фенолового красного. Смешивают растворы А и Б в соотношении 1:19; смесь разливают по 0,1 мл в уленгуттовские пробирки и вносят бактериологическую петлю исследуемой культуры. Пробирки выдерживают при 37...38 °С 30...40 мин и учитывают результат. В положительном случае раствор за счет расщепления мочевины и защелачивания среды приобретает малиново-красный цвет. *H. parasuis* уреазу не вырабатывает.

Биопроба. Метод применяют для определения вирулентных свойств культур *H. parasuis*. Суточной агаровой культурой в дозе $2 \cdot 10^9$ микробных клеток заражают внутрибрюшинно морских свинок массой 300...350 г. Наблюдение за животными ведут в течение 5 сут.

Актинобациллезная (гемофильная) плевропневмония. Инфекционная болезнь свиней преимущественно двух-трехмесячного возраста и откормочных животных. Характеризуется развитием фибринозно-геморрагической некротизирующей пневмонии и фибринозного плеврита.

Возбудитель — бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae*, род *Actinobacillus*, семейство Pasteurellaceae.

Лабораторная диагностика актинобациллезной плевропневмонии свиней основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных легких, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму и одним из методов для выявления капсулы. *A. pleuropneumoniae* — короткие грамотрицательные палочки с закругленными концами, чаще располагаются в виде парных коккобактерий, могут образовывать короткие цепочки, нитевидные формы, формируют капсулу, спор нет. Возбудитель в исследуемом материале обнаруживают в форме мелких коккобактерий, коротких палочек, окруженных капсулой, расположенных единично, парами, в виде коротких цепочек (рис. 106, 107).

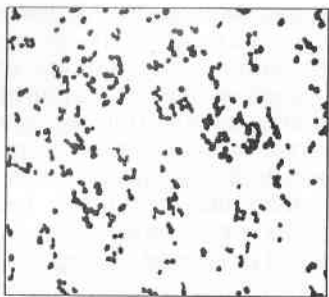


Рис. 106. *A. pleuropneumoniae*. Препарат из чистой культуры

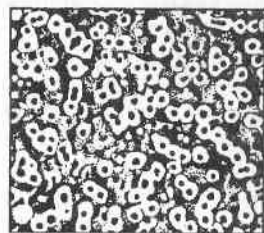


Рис. 107. *A. pleuropneumoniae*. Капсула. Окраска тушью

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Факультативный анаэроб, температурный оптимум 37...38 °С, рН 7,2...7,4. Известны два биовара возбудителя: ДПН-зависимый (Первый биовар), ДПН-независимый (Второй биовар).

Исследуемый материал засевают на 5%-й кровяной МПА с «бактерией-кормилкой» или «шоколадный» и сывороочно-дрожжевой МПА, в МПБ (5 % сывотки крови крупного рогатого скота, 10 % дрожжевого экстракта). Дрожжевой экстракт служит источником ДПН. Посевы инкубируют в условиях обычной атмосферы при 37...38 °С 24 ч.

При зараженности материала ДПН-зависимым возбудителем на кровяном МПА обнаруживают «сателлитные» мелкие (0,1...0,2 мм), гладкие, выпуклые, с ровными краями слизистые колонии, окруженные зоной бета-гемолиза. ДПН-независимые штаммы растут по всей поверхности кровяного МПА без «сателлитного» феномена. На «шоколадном» агаре оба биовара *A. pleuropneumoniae* формируют серо-белые колонии диаметром 1,0...2,6 мм правильной круглой формы, выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, слизистой консистенции.

На сывороочно-дрожжевом МПА колонии возбудителя серо-белые, полупрозрачные, диаметром 1...2 мм, правильной круглой формы, с ровными краями, гладкой поверхностью. При исследовании колоний на этой среде в пучке косопадающего света в бинокулярной лупе они видны как ярко-зеленые с красноватым оттенком, при наблюдении в косопадающем свете невооруженным глазом флуоресцируют.

В сывороочно-дрожжевом МПБ возбудитель растет с равномерным, средней интенсивности помутнением среды, позднее (48...72 ч) на дне пробирки образуется серо-белый осадок.

Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, на капсулы — по Гинсу, определяют наличие жгутиков микроскопией препарата «раздавленная капля». В мазках из

культур возбудитель обнаруживают в форме коротких грамтрицательных палочек с закругленными концами, вплоть до кокковидных, окруженных капсулой.

У культур с типичными для *A. pleuropneumoniae* признаками изучают ферментативные свойства. Возбудитель выделяет уреазу, щелочную фосфатазу, ДПН-зависимый (Первый биовар), разлагает с образованием кислоты без газа ксилосу, маннит, не утилизирует сорбит, салицин, мелибиозу, цитраты, не образует индол.

Известны 12 сероваров возбудителя. При необходимости устанавливают серовариантную принадлежность культуры в РДП, пробирочной РА.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Описать культуральные свойства *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*.
2. Приготовить мазки из культур *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*, окрасить по Граму, Гинсу, промикроскопировать, зарисовать.
3. Изучить ферментативные свойства *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* и методы определения сероваров пастерелл (демонстрация).
4. Провести бактериологическое исследование трупов мышей, зараженных *P. multocida*.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические и тинкториальные свойства возбудителей пастереллеза, гемофильного полисерозита и актинобациллезной плевропневмонии?
2. Каковы ферментативные свойства *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*?
3. Какими методами определяют ДПН-зависимость *H. parasuis* и *A. pleuropneumoniae*?
4. Какими методами определяют серовары *P. multocida*?
5. Какие выпускают противопастереллезные биопрепараты?

Тема 34

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА САПА, МЕЛИОИДОЗА И ПСЕВДОМОНОЗА НОРОК. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей и лабораторной диагностикой сапа, мелиоидоза, псевдомоноза норок и биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культуры *P. aeruginosa* на МПА в чашках Петри, в МПБ, набор тестов, характеризующих ферментативные свойства *P. aeruginosa*, покровные стекла для препарата

«раздавленная капля», биопрепараты для специфической профилактики и диагностики сапа и псевдомоноза норок.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Сап. Это инфекционная, хронически протекающая болезнь однокопытных животных (лошади, ослы, мулы, лошаки); восприимчивы представители семейства кошачьих и человек. Характеризуется возникновением в легких, на слизистой оболочке носа и различных участках кожи специфических узелков, склонных к распаду с образованием гноящихся язв.

Возбудитель сапа — бактерия *Pseudomonas mallei*, род *Pseudomonas*, семейство Pseudomonadaceae.

Лабораторная диагностика сапа основана на результатах серологических исследований (РСК); бактериологическое исследование проводят в исключительных случаях.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кровь, гнойное отделяемое язв, носовые выделения, пунктат лимфатических узлов, гной из абсцессов; от убитых животных берут участки пораженной ткани легких, печени, селезенки, лимфатических узлов, носовой перегородки, трахеи, бронхов и др.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В мазках из материала, окрашенных по Граму, возбудитель обнаруживают в виде прямых или слегка изогнутых, с закругленными концами грамотрицательных палочковидных бактерий размером (1,4...4) × 0,5 мкм, без спор и капсул (рис. 108). При окраске метиленовым синим Леффлера в клетках видна зернистость.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель сапа — аэроб, температурный оптимум 37...38 °С, рН 6,8...7, лучше растет на средах с добавлением глицерина (2...4 %). Исследуемый материал высевают на глицеринизированных МПА и в МПБ. Рост возбудителя появляется на первые-вторые сутки, иногда позже.

В МПБ возбудитель растет с помутнением среды, на дне пробирки образуется серо-белый слизистый осадок, на поверхности бульона может появляться пленка. На МПА возбудитель формирует гладкие, полупрозрачные, серовато-белые, с перламутровым оттенком колонии, постепенно сливающиеся в слизистый налет. Из выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, при микроскопии обнаруживают грамотрицательные полиморфные

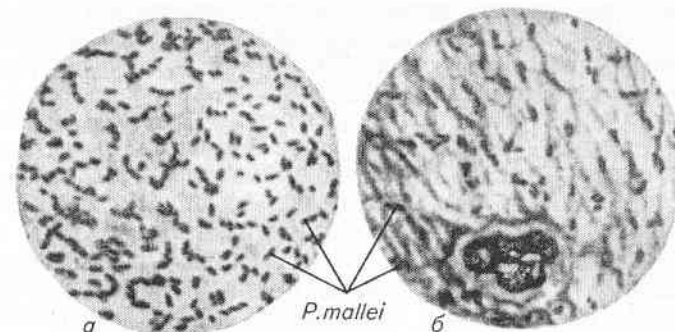


Рис. 108. *P. mallei*:
а — в культуре; б — в гное

палочки; в бульонных культурах клетки возбудителя короче — вплоть до кокковидных.

Характерным считают рост на глицериновом картофеле: через двое-трие суток появляются мелкие, полупрозрачные, с желтоватым оттенком колонии, которые затем сливаются в налет с желтоватым оттенком («медовым»), к шестому—восьмому дню цвет меняется до буро-коричневого или красноватого.

У бактерий с типичными для возбудителя сапа культурально-морфологическими свойствами изучают ферментативные признаки. *P. mallei* медленно, на 6...8-е сутки, свертывает молоко, разжижает желатину, расщепляет с образованием кислоты без газа глюкозу, лактозу, не утилизирует сахарозу, мальтозу, маннит. В странах тропической зоны Юго-Восточной Азии выделяют возбудителя «ложного сапа» (мелиоидоза, болезни Уитмора) — *P. pseudomallei*, вызывающего заболевание человека и животных. Для дифференциации *P. mallei* и *P. pseudomallei* используют признаки, указанные в таблице 32.

32. Дифференциальные признаки *P. mallei* и *P. pseudomallei*

| Признаки | <i>P. mallei</i> | <i>P. pseudomallei</i> |
|-----------------------------|------------------|------------------------|
| Ширина клетки, мкм | 0,5 | 0,8 |
| Длина клетки, мкм | 1,4...4,0 | 1,5 |
| Наличие жгутиков | — | + |
| Желтый и оранжевый пигменты | — | + |

Биопроба. Готовят тканевую суспензию на стерильном физиологическом растворе (соотношение 1:10) и вводят в объеме 0,5...1 мл подкожно в область шеи золотистым хомячком или в

объеме 3...5 мл морским свинкам. Стерильно взятым материалом (пунктат) заражают животных внутрибрюшинно. В положительных случаях на месте подкожной инъекции образуется язва с уплотненными краями, развивается конъюнктивит, ринит, у зараженных внутрибрюшинно самцов морских свинок — орхит (феномен Штрауса). Гибель хомячков наступает на 5...7-е сутки, морских свинок — на 8...15-е сутки или же болезнь переходит в хроническую форму. Павших и убитых животных подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика основана на результатах РСК. Диагностическим титром сыворотки считают разведение 1:10 при задержке гемолиза на четыре или три креста; задержку гемолиза на один, два креста при разведении сыворотки 1:10 и на три, четыре креста при разведении сыворотки 1:5 оценивают как сомнительный результат.

Аллергическая диагностика. Метод, применяемый в хозяйствах для контроля за благополучием лошадей по сапу (ставят офтальмопробу или внутрикожную пробу с маллеином).

Биопрепараты. Маллеин — диагностический сапной аллерген. При его изготовлении выращивают культуру возбудителя в глицеринизированном бульоне в течение четырех месяцев, стерилизуют автоклавированием, фильтруют через фильтр Зейтца, контролируют на стерильность, безвредность на белых мышцах, специфичность — на здоровых лошадях, стандартизируют по активности в единицах действия на лабораторных животных.

Сапной антиген для РСК готовят следующим образом: агаровую культуру возбудителя смывают фенолизированным физиологическим раствором, стерилизуют автоклавированием, отстаивают. В качестве антигена используют свободную от клеток культуральную жидкость, проверенную на стерильность, специфичность и активность.

Позитивная сапная сыворотка предназначена для определения активности антигена (РСК) и в качестве контроля при постановке РСК. Получают гипериммунизацией лошадей.

Мелиоидоз (ложный сап, болезнь Уитмора). Инфекционное заболевание животных (лошади, собаки, кролики, мелкий рогатый скот) и человека, протекающее в форме острой или хронической септицемии или септикопиемии.

Возбудитель — бактерия *Pseudomonas pseudomallei*, род *Pseudomonas*, семейство Pseudomonadaceae.

Лабораторная диагностика мелиоидоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию воз-

будителя по культурально-морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кровь, мокроту, мочу, гнойное отделяемое из абсцессов, участки пораженных органов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель представляет собой полиморфную грамтрицательную палочку размером (1,5...6) × (9,5...10) мкм, с закругленными концами, спор и капсул нет; лофотрих. В мазках-отпечатках из органов располагается одиночно или компактными скоплениями.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — аэроб, температурный оптимум 37 °С, рН 6,8...7,0, к питательным средам нетребователен. Исследуемый материал высевают на агар и в бульон с глицерином. При загрязнении материала посторонней микрофлорой его обрабатывают пенициллином (1000 ЕД/мл).

На плотных средах через 24 ч инкубирования возбудитель формирует мелкие, прозрачные, позднее мутнеющие беловатые колонии с металлическим блеском, могут появляться колонии R-формы и крупные (до 7 мм) M-формы. На кровяном агаре, глицеринизированных средах растет с образованием колоний кремово-оранжевого цвета. На жидких средах через 24...48 ч вызывает помутнение среды, образование пленки, которая после добавления нейтрального красного приобретает оранжево-красный цвет. Для бульонных культур характерен затхлый запах. Возбудитель в мазках из чистых культур располагается одиночно, парами, короткими цепочками или скоплениями по 5...7 штук.

У культур с типичными для *P. pseudomallei* культурально-морфологическими признаками исследуют ферментативные свойства. Возбудитель ферментирует с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, галактозу, дульцит, декстрин, не образует индол и сероводород, медленно разжижает желатину, свертывает и пептонизирует молоко, гидролизует аргинин.

Выделенные культуры также идентифицируют в серологических реакциях: РА, РНГА, РП.

Биопроба. Суспензией из материала заражают внутрибрюшинно (0,5...1,0 мл) крыс и морских свинок. В положительных случаях животные погибают в зависимости от вирулентности штамма на 3...15-е сутки. У самцов морских свинок может развиваться феномен Штрауса.

В качестве признаков для дифференциации *P. mallei* и *P. pseudomallei* используют морфологические критерии (см. табл. 32), а также способность *P. pseudomallei* синтезировать на кровяном агаре кремово-оранжевый пигмент, пептонизировать молоко, гидролизировать желатину, при заражении вызывать гибель крыс.

Псевдомоноз норок. Остро протекающее инфекционное заболевание. Характеризуется геморрагической пневмонией, призна-

ками сепсиса. Кроме норок восприимчивы лисицы, песцы; у животных других видов возбудитель может служить причиной пневмоний, послеродовых, постхирургических осложнений.

Возбудитель псевдомоноза норок — бактерия *Pseudomonas aeruginosa*, род *Pseudomonas*, семейство Pseudomonadaceae.

Лабораторная диагностика псевдомоноза норок основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пораженные участки легких, регионарные лимфатические узлы, селезенку, печень, почки.

Микроскопия препаратов из исходного материала. *P. aeruginosa* в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают в форме прямых или изогнутых грамотрицательных палочек длиной 0,5...1,4 мкм, шириной 0,2...0,4 мкм, без капсул и спор; образует жгутики. Располагается в виде одиночных клеток, коротких цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — аэроб, температурный оптимум 35...37 °С, к питательным средам нетребователен. Исследуемый материал высевают на МПА, в МПБ.

Через 24 ч рост *P. aeruginosa* в МПБ проявляется помутнением среды, образованием поверхностной пленки и серовато-белого осадка, за счет пигмента среда окрашена в сине-зеленый цвет, по мере старения культуры цвет колоний становится бурым. На МПА возбудитель формирует в основном два типа колоний: крупные (диаметр 2...5 мм), полупрозрачные, сероватые, гладкие, с плоскими краями и приподнятым центром, а также мелкие шероховатые. Штаммы, выделенные из респираторного и мочеполового тракта, могут образовывать слизистые колонии. Среда вокруг колоний окрашена за счет пигмента в сине-зеленый цвет. Возбудитель синтезирует четыре типа пигмента: пиоцианин (сине-зеленый или желто-зеленый), флуоресцеин, пиорубин и черно-бурый пигмент. Для культивирования *P. aeruginosa* при первичной изоляции из исследуемого материала используют специальные селективные среды с антибиотиками.

У выделенных культур изучают ферментативные свойства. Для *P. aeruginosa* характерны следующие признаки: образование аргининдигидролазы, оксидазы, гидролиз желатины, расщепление глюкозы, бета-аланина, D-, L-аспарагина, денитрификация и способность к росту при 41 °С.

Вид гетерогенен по соматическим O-антигенам. Для иденти-

фикации на уровне O-серогруппы используют РА на стекле, причем исследуют только культуры, у которых отмечены минимум два из трех физиологических признаков, характерных для вида: образование пигмента пиоцианина, расщепление глюкозы, рост при 41...42 °С. Используют набор из трех поливалентных и одиннадцати моновалентных сывороток. Антигеном служит 18...20-часовая агаровая культура *P. aeruginosa*, инактивированная кипячением в водяной бане в течение 1,5 ч [концентрация (3...5) · 10⁹/мл]. Антиген первоначально исследуют с поливалентными сыворотками, при получении положительного результата — с моновалентными, входящими в состав той или иной поливалентной сыворотки. Результат учитывают через 3...6 мин.

Биопрепараты. Моновалентную формолквасцовую вакцину против псевдомоноза норок готовят следующим образом: культуру вакцинного штамма (Шестой серотип) выращивают на питательной среде, инактивируют формалином, адсорбируют на квасцах, контролируют на стерильность, безвредность, активность.

Диагностические O-агглютинирующие сыворотки для серогрупповой идентификации *P. aeruginosa* включают в себя три поливалентные сыворотки: № 1 (03, 04, 05, 06, 07), № 2 (02, 08, 09), № 3 (010, 011, 012) и одиннадцать соответствующих моновалентных сывороток. Предназначены для идентификации *P. aeruginosa* на уровне O-серогруппы.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с биопрепаратами для серологической и аллергической диагностики сапа.
2. Изучить морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства *P. aeruginosa*.
3. Ознакомиться с биопрепаратами для специфической профилактики и диагностики псевдомоноза норок.

Контрольные вопросы

1. Каково значение бактериологического исследования для лабораторной диагностики сапа?
2. Какие иммунологические методы применяют для диагностики сапа?
3. Каковы биологические свойства возбудителя псевдомоноза норок?
4. Какие биопрепараты применяют для специфической профилактики псевдомоноза норок и серологической идентификации возбудителя?
5. В чем заключается бактериологическое исследование на мелиоидоз?

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА, КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА И ДИЗЕНТЕРИИ СВИНЕЙ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики лептоспироза, кампилобактериоза и дизентерии свиней, биологическими свойствами возбудителей, биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Пробирки с культурой лептоспир, предметные и покровные стекла, стерильные пастеровские пипетки, мерные пипетки на 1...2 мл, резиновые груши, спирт, микроскопы с темнопольными конденсорами, осветители ОИ-19, пробирки со стерильной дистиллированной водой и физиологическим раствором, пластины из плексигласа с лунками или чистые пробирки в штативах, лептоспирозные агглютинирующие сыворотки, антигены для диагностики лептоспироза в РМА, для демонстрации — пробирки с культурой лептоспир (*L. biflexa*), таблицы, мазки для люминесцентной микроскопии, МЛ-2, нефлуоресцирующее масло, культуры кампилобактерий в полужидкой среде, среде Китта-Тароцци и на плотной среде, неокрашенные мазки с кампилобактериями, таблицы, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Лептоспироз. Инфекционное природно-очаговое заболевание животных — свиней, крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз, оленей, собак, верблюдов, пушных зверей, грызунов, сумчатых и др. Болеет и человек. Птицы к лептоспирозу невосприимчивы.

У животных болезнь протекает, как правило, бессимптомно, типичные клинические проявления: кратковременная лихорадка, желтуха, геморрагия, гемоглобинурия, аборт.

Возбудитель лептоспироза отнесен к роду *Leptospira*, который включает в себя два вида: *L. interrogans* — патогенные лептоспиры и *L. biflexa* — лептоспиры, обитающие во влажной почве и пресных поверхностных водах. Вид патогенных лептоспир представлен 183 сероварами, которые по степени антигенного родства объединены в 25 серологических групп. Основными возбудителями лептоспироза у сельскохозяйственных животных считают лептоспиры серогрупп *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Pomona*, *Tarassowi*, *Icterohaemorrhagiae*.

Лабораторная диагностика лептоспироза основана на результатах бактериологического и серологических исследований.

Бактериологическое исследование вклю-

чает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и методом биопробы и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, серологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. Кровь берут в период лихорадки на 1...7-е сутки болезни; мочу собирают при естественном мочеиспускании в стерильные пробирки. У коров и свиноматок допустимо брать мочу катетером. Абортированный плод доставляют в лабораторию целиком или берут от него желудок с содержимым, сердце, мочевой пузырь, паренхиматозные органы. От трупов крупных животных направляют на исследование сердце, кусочки паренхиматозных органов, почку целиком, транссудат из грудной и брюшной полостей, перикардиальную жидкость, мочевой пузырь с содержимым, спинномозговую жидкость. Трупы мелких животных доставляют в лабораторию целиком.

Пробы материала должны быть исследованы в летнее время в течение 6 ч с момента взятия и 10...12 ч при хранении материала в охлажденном состоянии; мочу исследуют при температуре 30...40 °С в течение 3 ч, при 25...30 °С — 4...5 ч, при 20...25 °С — 6...8 ч, при 16...20 °С — в течение 10...12 ч с момента взятия.

Для бактериологического исследования материал предварительно следует подготовить: мочу центрифугируют (при 10 000...15 000 мин⁻¹ 30 мин), исследуют осадок; из проб органов готовят суспензию в стерильном физиологическом растворе, исследуют в нативном состоянии или после центрифугирования.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Лептоспиры разных сероваров не различаются по морфологическим и культуральным признакам. Длина лептоспир колеблется от 3 до 30 мкм и более, в среднем 7...15 мкм, ширина 0,06...0,15 мкм. Лептоспиры — грамтрицательные бактерии. Поскольку они плохо воспринимают окраску, их обычно исследуют в неокрашенном состоянии. Готовят препарат «раздавленная капля» и изучают методом темнопольной микроскопии при увеличении 40 × 7...10 или 20 × 1,5 × 10, а для более детального изучения — при увеличении 40 × 10...15 или 40 × 1,5 × 10. В каждой капле просматривают не менее 50 полей зрения. Лептоспиры представляют собой спиралевидные тонкие серебристые нити, концы которых — один или оба — загнуты в виде крючков (рис. 109).

Лептоспиры подвижны. Формы движения: вращательное, прямолинейное, поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси и круговое.

Для люминесцентной микроскопии готовят мазки из того же материала и обрабатывают их флуоресцирующим глобулином для диагностики лептоспироза.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Лептоспи-

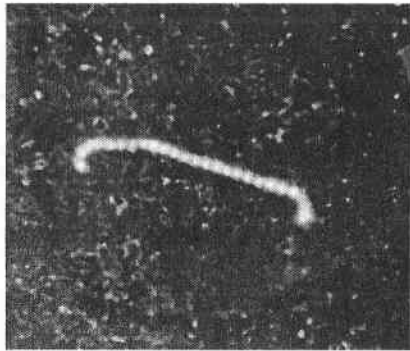


Рис. 109. Лептоспира в темном поле (×40)

ры — факультативные анаэробы, температурный оптимум 28...30 °С. Для получения культуры лептоспир исследуемый материал высевают пастеровской пипеткой по три-пять капель в 5...7 пробирок со специальной питательной жидкой или полужидкой средой. Посевы культивируют при 28...30 °С в течение трех месяцев. Обычно рост лептоспир появляется в течение 7...20 сут, иногда их обнаруживают на 3...5-е сутки или через 1...2 мес и очень редко — через 2,5...3 мес культивирования.

Для выявления роста лептоспир через 3, 5, 7, 10 сут и далее каждые 5 сут культивирования из всех пробирок готовят препарат «раздавленная капля» для исследования методом темнопольной микроскопии.

Макроскопически рост лептоспир выражен слабо. При достаточном накоплении лептоспир после встряхивания пробирки с культурой в среде в проходящем свете заметны муаровые волны, а в спокойном состоянии отмечают легкую опалесценцию. Наличие пленки, осадка, помутнения среды свидетельствуют о присутствии посторонней микрофлоры, а полная прозрачность среды — об отсутствии роста лептоспир.

Для культивирования лептоспир используют следующие питательные среды.

Среда Ферворта—Вольфа (в модификации С. И. Тарасова): к 900 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 г хлорида натрия, 1 г пептона (Дифко), 100 мл маточного раствора фосфатного буфера рН 7,2...7,4. Смесь автоклавируют в колбе при 120 °С 30 мин. На следующий день дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 мл и вновь автоклавируют при 120 °С 30 мин. В пробирки добавляют по 0,5 мл кроличьей сыворотки и прогревают среду на водяной бане при 56...58 °С 30 мин.

Среда Любашенко: нехлорированную водопроводную (или колодезную, речную) воду, профильтрованную через бумажный фильтр, стерилизуют в автоклаве при 1 атм 30 мин, охлаждают, устанавливают рН 7,3...7,4, добавляют 5 % кроличьей или бараньей сыворотки, прогретой при 56 °С в течение 1 ч. Затем среду пропускают через фильтрующие пластины СФ в фильтре Зейтца и асептически разливают в пробирки. Для контроля стерильности среды пробирки помещают в термостат при 37 °С на 48 ч.

Можно применять и другие питательные среды. На плотных средах (Кокса, ВГНКИ и др.) лептоспиры образуют мелкие колонии в виде прозрачных дисков диаметром до 1...2 см с хорошо очерченными или размытыми краями или в виде матовых точек диаметром 1...2 мм.

Для серологической идентификации выделенную чистую культуру исследуют в РМА с групповыми агглютинирующими лептоспирозными сыворотками, предварительно разведенными стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:50, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16 000 и 1:32 000. Реакцию ставят в агглютинационных пластинах (или в пробирках), смешивая 0,1 мл сыворотки каждого разведения с 0,1 мл выделенной (типизируемой) 5-, 7-, 10-суточной культуры лептоспир с накоплением 70...100 подвижных микробных клеток. Разведения сыворотки последовательно удваиваются. Пластины (пробирки) выдерживают в термостате при 37 °С 1 ч, затем учитывают результаты — из каждой лунки (начиная с наибольшего разведения) готовят препараты «раздавленная капля», которые исследуют методом темнопольной микроскопии. Реакцию оценивают в крестах: (++++) — 100%-я агглютинация: склеивание лептоспир с образованием скоплений в виде «паучков» (рис. 110), содержащих от нескольких клеток до нескольких десятков и даже сотен; свободные концы клеток сохраняют подвижность; (+++) — агглютинировано 75 % лептоспир; (++) — 50 %; (+) — агглютинировано 25 %; (—) — агглютинация отсутствует. РМА считают положительной, если она выражена на четыре, три и два креста. Исследуемую культуру относят к той серологической группе лептоспир, с сывороткой которой она дает реакцию на два...четыре креста до 50...100 % ее титра, указанного на этикетке.

Биопроба. Метод используют для выделения культуры возбудителя из исследуемого материала, так как посевом на питательные среды изолировать лептоспиры удастся не всегда, а также для установления патогенных свойств чистых культур. Биопробу ставят на золотистых хомячках 20...30-дневного возраста, крольчатах-сосунках в возрасте 10...20 дней и 3...5-недельных морских свинках. Исследуемый материал (кровь, моча, суспензия из паренхиматозных органов или аборти-

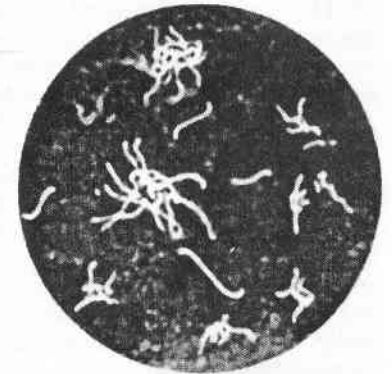


Рис. 110. Реакция микроагглютинации: «паучки» из склеившихся лептоспир

рованного плода и др.) вводят подкожно или внутривентриально хомякам от 0,3...0,5 до 1 мл, крольчатам — 2...3 мл. На каждую пробу материала берут по 2 животных, одного из которых убивают на 4...5-й день в период подъема температуры, другого, если животное не погибает, — на 14...16-й день после заражения. Кровь последнего исследуют в реакции микроагглютинации (РМА), начиная с разведения 1 : 10, с лептоспирами 13 серологических групп.

Высевы из органов убитых и павших животных (сердца, печени и почек) делают в 2...3 пробирки из каждого органа. Транссудат из грудной и брюшной полостей, перикардальную жидкость, содержимое мочевого пузыря исследуют методом темнопольной микроскопии.

Вирулентность выделенной культуры определяют на золотистых хомячках или крольчатах, которых заражают внутривентриально 5...7-дневной культурой, содержащей 70...100 лептоспир в поле зрения микроскопа. Высоковирулентные культуры лептоспир вызывают гибель золотистых хомячков в дозе менее 0,1 мл, средней вирулентности — 0,2...0,4 мл, слабовирулентные — 0,5...1 мл.

Серологическая диагностика включает в себя постановку реакции микроагглютинации (в качестве антигена используют живые культуры лептоспир определенных серологических групп) и реакции макроагглютинации (применяют концентрированную взвесь лептоспир).

В реакции микроагглютинации сыворотки крови исследуют в разведениях 1 : 50, 1 : 250, 1 : 1250.

Учет реакции: каплю из каждой лунки исследуют методом темнопольной микроскопии при увеличении 20×10 или $20 \times 7 \times 1,5$. Агглютинация проявляется в образовании «паучков», содержащих от 3...5 до нескольких десятков лептоспир.

Специфические антитела в сыворотке крови животных в титре 1 : 50...1 : 100 и выше свидетельствуют об инфицированности данной особи лептоспирами и возможном лептоспираноносительстве.

По результатам серологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство неблагополучным по лептоспирозу, если специфические антитела обнаружены в сыворотке крови при однократном исследовании в РМА в титре 1 : 100 и выше более чем у 25 % обследованных животных, а также при нарастании титра антител в 5 раз и более при повторном исследовании через 7...10 дней сыворотки крови в РМА или при обнаружении антител у ранее нереагировавших животных.

Сыворотки животных, дающие положительную реакцию микроагглютинации в равных титрах с лептоспирами нескольких серологических групп или дающие наиболее высокий титр с лептоспирами, ранее неизвестными в качестве возбудителя лептоспироза сельскохозяйственных животных, исследуют в реакции иммуноадсорбции.

Для постановки реакции иммуноадсорбции все штаммы лептоспир, с которыми данная сыворотка дала положительную реакцию микроагглютинации, выращивают в 0,5...1-литровых флаконах в течение 5...7 сут. Затем культуры лептоспир осаждают центрифугированием при $10\,000 \text{ мин}^{-1}$ 30 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок суспендируют в 0,9 мл питательной среды или физиологического раствора, 0,1 мл исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 мл концентрированного антигена и выдерживают в течение 48 ч при $1...5^\circ\text{C}$. Отделяют сыворотку центрифугированием при $10\,000 \text{ мин}^{-1}$ 30 мин. Адсорбированную сыворотку проверяют в реакции микроагглютинации на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту, а затем исследуют с лептоспирами всех групп, с которыми сыворотка дала положительную реакцию до адсорбции. В результате адсорбции лептоспиры, являющиеся возбудителем, удаляют из сыворотки антитела к лептоспирам всех других серологических групп; гетерологичные типы лептоспир не адсорбируют антитела к штамму-возбудителю.

Реакцию макроагглютинации ставят на стекле, на которое наносят каплю исследуемой сыворотки крови, разведенной в соотношении 1 : 100, и равное количество антигена, компоненты перемешивают, результат учитывают в проходящем свете. Положительным результатом считают агглютинацию интенсивностью на два креста и выше, сомнительным — на один крест.

Антитела в крови можно обнаружить также методом иммуноферментного анализа.

Биопрепараты. Депонированная поливалентная вакцина против лептоспироза животных ВГНКИ содержит шесть штаммов лептоспир с наиболее выраженными антигенными и иммуногенными свойствами, относящихся к серогруппам *Pomona*, *Tarassovi*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*. Выращенные культуры лептоспир сливают в общую емкость, инактивируют, концентрируют, добавляют адъювант. Вакцину проверяют на стерильность, безвредность и активность (на кроликах).

Поливалентную вакцину против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных готовят из 7...10-дневной культуры лептоспир, консервированных 5%-м раствором карболовой кислоты до конечного содержания фенола в вакцине 0,5 %. Вакцину контролируют на стерильность, безвредность и активность (на кроликах).

Поливалентную сыворотку против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных получают методом гипериммунизации волов-производителей. Антигены для гипериммунизации готовят из производственных штаммов шести серогрупп. Сыворотку консервируют 5%-м раствором фенола, проверяют на стерильность, безвредность (на белых мышах и морских

свинках) и активность (в реакции микроагглютинации в разведениях от 1 : 1000 до 1 : 100 000).

Антигены для диагностики лептоспироза реакцией макроагглютинации готовят из эталонных штаммов лептоспир. Выращенные культуры инактивируют формалином, концентрируют, расфасовывают по ампулам и подвергают сублимационному высушиванию. Антигены контролируют на растворимость в физиологическом растворе, на концентрацию. Активность антигена проверяют в РА на стекле с гомологичной лептоспирозной агглютинирующей сывороткой.

Групповые агглютинирующие лептоспирозные сыворотки предназначены для определения серогрупповой принадлежности лептоспир, выделенных из патологического материала, а также лептоспир, используемых в качестве антигенов в реакции микроагглютинации при серологической диагностике лептоспироза.

Кампилобактериоз (вибриоз). Хроническое заболевание крупного рогатого скота, овец, свиней, которое проявляется абортными, задержанием последа, временным бесплодием, вагинитами, метритами, рождением нежизнеспособного потомства. У кур возбудитель вызывает падеж цыплят, снижение яйценоскости несушек и прироста массы у бройлеров, у людей — гастроэнтериты, бактериемию, кожные поражения.

Возбудитель кампилобактериоза — бактерии семейства Spirillaceae, род *Campylobacter*. Основные виды: *C. fetus* (подвиды *C. fetus venerealis* и *C. fetus fetus*), *C. jejuni*, *C. sputorum* (подвиды *C. sputorum sputorum*, *C. sputorum bubulus*, *C. sputorum faecalis*) и непатогенный *C. coli* (табл. 33). *C. fetus sb. fetus* вызывает аборты у овец, крупного рогатого скота. *C. fetus sb. venerealis* — патогенен для крупного рогатого скота. *C. jejuni* вызывает аборты у овец, энтериты у телят, ягнят и других животных. *C. mucosalis* патогенен для свиней, его выделяют от животных с признаками некротического энтерита, локального илеита.

33. Дифференциальные признаки видов и подвидов рода *Campylobacter*

| Признак | <i>C. fetus</i> | | <i>C. jejuni</i> | | <i>C. mucosalis</i> | <i>C. sputorum</i> | | |
|--|-----------------|-------------------|------------------|---------------|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | подвиды | | подвиды | | | биовары | | |
| | <i>fetus</i> | <i>venerealis</i> | <i>jejuni</i> | <i>doylei</i> | | <i>sputorum</i> | <i>bubulus</i> | <i>faecalis</i> |
| Каталаза | + | + | + | + | — | — | — | + |
| Рост при 25 °С | + | + | — | — | + | — | — | — |
| 42 °С | d | — | + | + | + | + | + | + |
| Рост на средах, содержащих 1 % глицина | + | — | + | + | + | + | + | + |
| 1 % желчи | + | + | + | + | + | + | — | — |

| Признак | <i>C. fetus</i> | | <i>C. jejuni</i> | | <i>C. mucosalis</i> | <i>C. sputorum</i> | | |
|--|-----------------|-------------------|------------------|---------------|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | подвиды | | подвиды | | | биовары | | |
| | <i>fetus</i> | <i>venerealis</i> | <i>jejuni</i> | <i>doylei</i> | | <i>sputorum</i> | <i>bubulus</i> | <i>faecalis</i> |
| Чувствительность к налидоксовой кислоте (30 мкг на диск) | — | — | — | + | d | d | d | — |
| к цефалотину (30 мкг на диск) | + | + | — | + | + | + | + | + |
| Гидролиз гиппурата | — | — | + | Нет данных | — | — | — | — |
| Редукция нитратов | + | + | + | — | + | + | + | + |
| Редукция нитритов | — | — | — | Нет данных | d | d | d | + |

Примечание: «+» — 90 % штаммов и более положительные; «—» — 90 % штаммов и более отрицательные; d — 11...89 % штаммов положительные.

Лабораторная диагностика кампилобактериоза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют абортный плод (целиком с плодными оболочками или от крупных плодов голову, желудок, легкие, печень); плаценту; слизь из шейки матки, взятую стерильно в первые 3...4 дня после аборта или в период охоты; от быков-производителей — препуциальную слизь и секрет придаточных половых желез; от убитых с диагностической целью животных — матку, влагалище, лимфоузлы тазовой области.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Представители рода *Campylobacter* — грамтрицательные, полиморфные, тонкие палочки, изогнутые в виде «крыла чайки», запятой, спирали с одним или несколькими завитками или S-образные. Средние размеры (0,5...8) × (0,2...0,8) мкм. Подвижны за счет одного полярного жгутика на одном или обоих концах клетки, движение винтообразное; спор и капсул не образуют (рис. 111).

В мазках из патологического материала кампилобактерии обнаруживают в виде «крыла чайки», запятой или S-образной формы; от животных, подвергавшихся лечению, — в виде длинных спиралей, малоизвитых нитей и мелких кокковидных форм.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — микроаэрофил, температурный оптимум 37...38 °С. Для получения культуры кампилобактерий используют полужидкие и

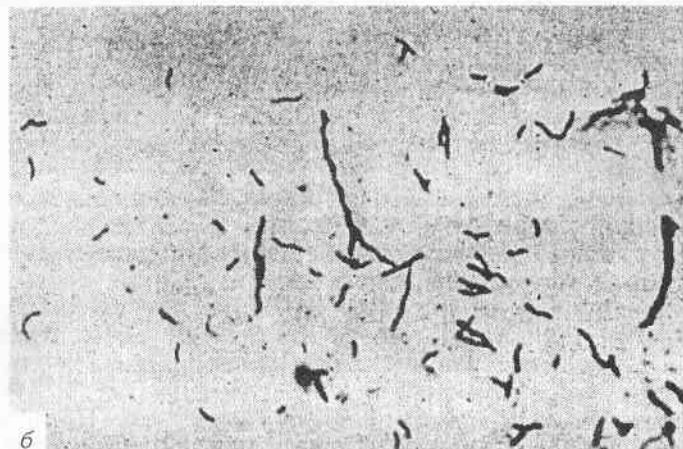
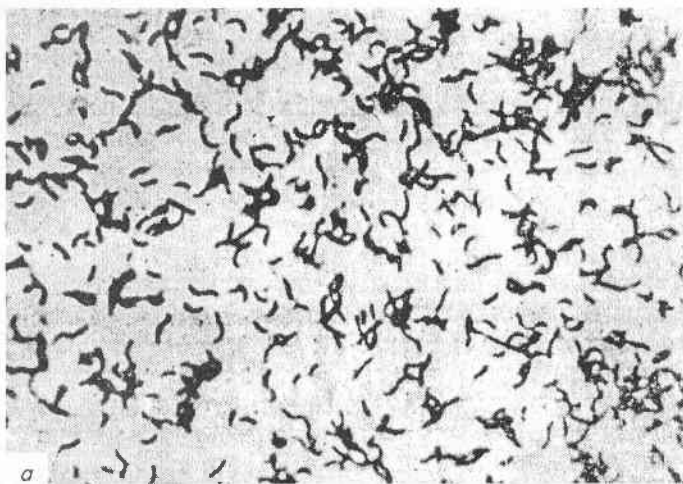


Рис. 111. Кампилобактерии:

а — короткие; б — длинные, спиралловидные

плотные питательные среды: плотный 2...3%-й МППА и полужидкий 0,2%-й мясо-печеночный пептонный агар (ПЖА), среду Китта—Тароцци без масла, агар Мартена, сафранино-железо-новобиициновую (СЖН) среду. Для обогащения в питательные среды добавляют 5...10 % дефибринированной крови крупного рогатого скота, овец, кроликов или сыворотку крови лошади. Культивируют в течение 6...10 сут в микроаэрофильных условиях при замене 10...15 % воздуха оксидом углерода (IV). Контаминируют

ванный материал высевают на среду СЖН: полужидкий агар — 985 мл, 2%-й раствор сульфата железа — 5 мл, 0,5%-й водный раствор сафранина Т — 5 мл и 0,2%-й водный раствор новобиицина — 5 мл. Среду фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки и автоклавируют при 115 °С 25 мин. Готовая к использованию среда должна быть розового цвета, рН 6,8. При культивировании на данной среде кампилобактерий ее цвет не изменяется, другой микрофлоры — приобретает ярко-желтую окраску.

Каждую пробу высевают на несколько чашек Петри, растирая шпателем по поверхности среды. Выросшие колонии пересевают на полужидкий кровяной, сывороточный агар или среду Китта—Тароцци для получения чистой культуры.

При первичном выделении на плотной среде кампилобактерии образуют через 3...4 сут колонии: гладкие, бесцветные, диаметром 1 мм или шероховатые, непрозрачные, белые или кремовые до 2 мм в диаметре, могут быть плоские, серые или светло-коричневые с неровными краями, редко растут в виде тонкого налета. На кровяном агаре гемолиза не дают. При росте на сывороточном бульоне дают слабое помутнение, иногда с образованием незначительного рыхлого осадка, на полужидком агаре растут в виде серовато-голубого диска около поверхности среды.

У выделенных культур кампилобактерий изучают ферментативную активность, ростовые потребности и на основании полученных данных идентифицируют их на уровне вида, подвида, биовара (см. табл. 33).

Для серологической идентификации кампилобактерий выпускают агглютинирующие и люминесцирующие сыворотки против *C. fetus subsp. fetus* (так называемый Первый тип), *C. fetus subsp. venerealis* (Второй тип), *C. sputorum subsp. bubulus* (Третий тип).

Для ориентировочной идентификации выделенных культур ставят РА на стекле, используя указанные сыворотки, разведенные 1 : 50.

Для окончательной серологической идентификации кампилобактерий ставят пробирочную РА: готовят последовательные разведения каждой из трех моноспецифических сывороток в 3%-м растворе хлорида натрия, содержащем 0,3 % формалина, — 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200. Затем в каждую пробирку с указанными разведениями моноспецифических сывороток добавляют по 0,5 мл исследуемой суспензии вибрионов (концентрация $1 \cdot 10^9$).

После внесения компонентов пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37 °С до следующего дня. Затем их выдерживают 3...4 ч при комнатной температуре и учитывают результаты реакции.

При положительной реакции с моноспецифической сывороткой одного типа и отрицательной — с моноспецифическими сы-

воротками остальных двух типов исследуемый штамм относят к тому типу, с которым получен положительный результат.

При получении положительной реакции с двумя моноспецифическими сыворотками (что может быть при выделении атипичных или диссоциированных штаммов) опыт повторяют с обеими моноспецифическими сыворотками, агглютиниравшими исследуемую суспензию вибрионов, применяя более высокие разведения, чтобы определить титр каждой сыворотки. Типовую принадлежность исследуемого штамма устанавливают по той моноспецифической сыворотке, которая агглютинирует микробную суспензию в более высоком титре.

Для идентификации возбудителей кампилобактериоза в реакции иммунофлуоресценции используют как чистые, так и смешанные культуры, выращенные на общепринятых питательных средах.

Биопроба. Нативным материалом или выделенной культурой заражают беременных морских свинок внутрибрюшинно или во влагалище с последующим исследованием абортированных плодов. Если в течение 10...12 сут аборт не наступает, морских свинок убивают и исследуют содержимое полости матки и плоды. При необходимости биопробу ставят на беременных телках и овцах, заражая их подкожно или перорально. Животные абортируют, при отсутствии аборта их убивают с диагностической целью.

Серологическая диагностика кампилобактериоза у коров основана на результатах реакции агглютинации с вагинальной слизью (РАВС), а у овец — РА с сывороткой крови.

Слизь берут марлевым тампоном, который помещают в пробирку с 5 мл формализованного 3%-го раствора хлорида натрия. Выдерживают при температуре 1...4 °С 12...14 ч. Тампон отжимают, жидкость центрифугируют при 2500...3000 мин⁻¹ 30 мин.

После центрифугирования реакцию ставят с экстрактом вагинальной слизи в четырех разведениях (табл. 34). Для приготовления кампилобактериозного антигена исходную концентрированную суспензию бактерий разводят физиологическим раствором, содержащим 0,3 % формалина, в соотношении 1 : 10.

34. Постановка реакции агглютинации с экстрактом вагинальной слизи (РАВС) для диагностики кампилобактериоза

| Компонент | Количество компонента (мл) в пробирке | | | |
|---|---------------------------------------|-----|-----------------|-----|
| | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й |
| Формализованный 3%-й раствор хлорида натрия | — | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Исходный экстракт слизи | 0,5 | 0,5 | Перенос по 0,5* | |
| Суспензия кампилобактериозного антигена (1 · 10 ⁹) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Перемешивают встряхиванием. | | | | |
| Инкубирование при 37 °С 24 ч, затем при комнатной температуре 3...6 ч | | | | |

*Удалить 0,5 мл из последней пробирки

Наряду с исследуемыми пробами материала ставят контроли антигена: 1) контроль антигена (проверка самоагглютинации): в пробирку наливают 0,5 мл антигена в рабочем разведении и добавляют 0,5 мл 3%-го формализованного раствора хлорида натрия; 2) контроль активности антигена: в каждую пробирку с разведенной агглютинирующей кампилобактериозной сывороткой Первого типа добавляют по 0,5 мл антигена; 3) контроль специфичности антигена: в две пробирки, содержащие по 0,5 мл нормальной сыворотки в разведениях 1 : 100 и 1 : 200, добавляют по 0,5 мл антигена. Все пробирки встряхивают и далее поступают с ними так же, как с опытными.

Вначале учитывают результаты контроля антигена. Отрицательная реакция в первом и третьем контроле при положительной во втором свидетельствует о правильности постановки реакции.

Учет результатов: 1) положительная — реакция хорошо выражена (на три-четыре креста) во всех пробирках или только в 1-й и 2-й; 2) сомнительная — агглютинация на один-два креста в 1-й и во 2-й пробирках; 3) отрицательная — отсутствие агглютинации во всех пробирках.

У больных овец для исследования берут сыворотку крови, разводят ее в 100, 200 и 400 раз. Результат считают положительным, если исследуемая сыворотка дает положительную реакцию агглютинации в разведении 1 : 200 и выше на четыре или три креста, сомнительным — на четыре или три креста в разведении 1 : 100 либо на два или один крест в разведении 1 : 200, отрицательным — если агглютинация отсутствует или ее оценивают не выше чем на два или один крест в разведении 1 : 100. Сыворотку овец, вакцинированных против кампилобактериоза, серологически не исследуют.

Кроме реакции агглютинации сыворотку животных можно исследовать в РСК, реакции иммунофлуоресценции или реакции иммунной сорбции антител, меченных ферментами. Разработаны экспериментальные партии диагностикумов для выявления антител в РНГА, пригодные для диагностики кампилобактериозов животных и человека.

Биопрепараты. Эмульсинвакцина инактивированная против кампилобактериоза овец.

Кампилобактериозные агглютинирующие сыворотки готовят методом гипериммунизации кроликов суспензией живых микробов кампилобактерий. Полученные сыворотки после адсорбции групповых антител проверяют на активность, специфичность и стерильность.

Кампилобактериозный антиген представляет собой инактивированную 0,3%-м раствором формалина суспензию кампилобактерий Первого типа (концентрация микробных клеток 10¹⁰/мл). Предназначен для диагностики кампилобактериоза у крупного рогатого скота.

Дизентерия свиней. Инфекционная болезнь. Характеризуется геморрагическим поносом и некротическим поражением толстого отдела кишечника. Восприимчивы свиньи всех возрастов, но чаще болеет молодняк в возрасте 1...6 мес.

Возбудитель дизентерии свиней — спирохета *Serpulina hyodysenteriae*, род *Serpulina*.

Лабораторная диагностика дизентерии свиней основана на результатах бактериологического исследования.

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

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии, для посмертной — слизистую оболочку большой ободочной кишки, которую соскабливают после удаления из кишечника содержимого и промывания водой. От трупов материал берут не позднее чем через 2 ч после гибели животного, материал должен быть исследован в течение 2...4 ч, а при хранении на холоде — 6...8 ч.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Поскольку культивирование возбудителя весьма трудоемко, микроскопическое исследование — это основной метод диагностики, доступный практическим лабораториям. Поступивший материал исследуют методом темнопольной, фазово-контрастной или обычной световой микроскопии.

При темнопольной микроскопии препарат «раздавленная капля» исследуют в водной иммерсии с объективом $\times 40$ и окулярами $\times 7$ или $\times 10$. Возбудитель в этом случае виден как спиралевидная клетка с 3...12 правильными витками размером $(7...9) \times (0,3...0,4)$ мкм, движущаяся змеевидно-поступательно. При температуре 22 °С наблюдают изгибание и скользящее движение клетки, а при 37...42 °С клетка движется поступательно. У большинства больных дизентерией свиней в препарате «раздавленная капля» в одном поле зрения обнаруживают 5...10 спирохет и более. В окрашенных по Граму препаратах видны грамотрицательные извитые клетки со строением, типичным для спирохет. Клетки возбудителя хорошо окрашиваются по Романовскому—Гимзе, фуксином Пфейффера. Сходные по морфологии с *Serpulina hyodysenteriae* вибрионы, обитающие в кишечнике, отличаются тем, что их клетка в 2...4 раза толще, с тупыми концами, движение вращательное вокруг длинной оси.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — строгий анаэроб, температурный оптимум 36...38 °С, при 25 и 30 °С не растет, рН 7,0...7,2. Для первичной изоляции используют селективные среды, например следующие.

Кровяной агар со спектомицином: к перевару Хоттингера добавляют 0,001 % резазурина (индикатор ОКВП), 0,5 % хлорида натрия, 0,25 % глюкозы, 1 % пептона, 2 % агара, кипятят, пропускают через среду азот или оксид углерода (IV) в течение 10...15 мин, устанавливают рН 7,0...7,2, вносят 0,05 % гидрохлорида цистеина. Среду автоклавируют при 110 °С 30 мин, охлаждают до 40...45 °С, пропускают при этом через среду стерильный обескислороженный газ, после чего вносят 10 % дефибринированной крови барана (или крупного рогатого скота) и 400 мкг/мл спектомицина. Среду разливают в атмосфере оксида углерода (IV).

Культивируют также в жидкой или полужидкой среде, содержащей сердечно-мозговую вытяжку и 10 % эмбриональной телячьей или кроличьей сыворотки. На кровяном агаре через 48...96 ч инкубирования при 38 °С вырастают плоские просвечивающие колонии диаметром 0,5...3 мм с зоной бета-гемолиза. В полужидком сывороточном агаре возбудитель растет в виде беловатого диффузного облачка ближе к поверхности среды.

После изучения морфологии и культуральных свойств у выделенных бактерий исследуют ферментативную активность. Патогенные для свиней культуры гидролизуют эскулин, не ферментируют фруктозу, утилизируют пируват, при сбраживании глюкозы образуют водород, углекислоту, ацетат, бутират; нитрат не восстанавливают; растут на средах, содержащих 6,5 % хлорида натрия, но не растут на средах с 1 % глицина.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Из чистой культуры лептоспир приготовить препараты «раздавленная капля» и изучить их методом темнопольной микроскопии.

2. Поставить РМА с культурой лептоспир и двумя сыворотками различных антигенных групп в пробирках или на пластинах, учесть результат реакции, начиная с наибольшего разведения сыворотки. Из пробирки (лунки) каждого разведения сыворотки приготовить препарат «раздавленная капля» и изучить методом темнопольной микроскопии.

3. Окрасить мазки с кампилобактериями по Граму, промикроскопировать, зарисовать.

4. Изучить характер роста кампилобактерий на питательных средах и сделать заключение о морфологических и тинкториальных свойствах возбудителя.

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются особенности микроскопирования лептоспир?
2. Каковы морфологические и культуральные свойства лептоспир?
3. Каковы правила взятия патологического материала для исследования на лептоспироз?

4. Какие методы применяют для серологической диагностики лептоспироза?
5. Как ставят биопробу при лептоспирозе?
6. Каковы морфологические и тинкториальные свойства возбудителя кампиллобактериоза?
7. В чем состоит серологическая диагностика кампилобактериоза?
8. Каковы морфологические особенности возбудителя дизентерии свиней?

Тема 36

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОПЛАЗМОЗОВ, РИККЕТСИОЗОВ И ХЛАМИДИОЗОВ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей, методами лабораторной диагностики микоплазмозов, риккетсиозов, хламидиозов, а также биопрепаратами.

Оборудование и материалы. Культуры микоплазм на жидких и плотных питательных средах, готовые фиксированные препараты риккетсий (вакцинный штамм), хламидий, красители для окраски по Стампу, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Контагиозная перипневмония крупного рогатого скота (повальное воспаление легких). Инфекционная болезнь, протекающая в виде крупозной пневмонии и плеврита с последующим развитием анемических некрозов в легких.

Возбудитель контагиозной перипневмонии крупного рогатого скота — *M. mycoides subsp. mycoides*, род *Mycoplasma*, семейство *Mycoplasmataceae*.

Лабораторная диагностика перипневмонии крупного рогатого скота основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики используют бронхиальную слизь, секрет молочной железы, мочу, а для посмертной (от животных, убитых с диагностической целью — в начале болезни или не позднее 2...3 ч после гибели) — асептично полученный плевральный экссудат, медиастинальные, бронхиальные лимфоузлы, пораженные участки легких. Материал помещают в стерильную посуду и пересылают в лабораторию нарощенным в термосе со льдом или в замороженном виде.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Для микоплазм характерен выраженный полиморфизм, что обусловлено отсутствием ригидной клеточной стенки. Средние размеры микоплазм 0,1...0,2 мкм. В ранней экспоненциальной стадии роста форма клеток сферическая или овальная, позднее клетки удлиняются вплоть до нитей (рис. 112). Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по методу Романовского—Гимзы или Грама. Краску Романовского—Гимзы разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 10 и препараты окрашивают в течение 24 ч при комнатной температуре. Клетки микоплазм обнаруживают в форме кокков, дисков, гроздевидных скоплений, тонких разветвленных нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Для получения культуры возбудителя исследуемый материал высевает на плотные и жидкие питательные среды. Микоплазмы прихотливы к условиям культивирования, поэтому в питательные среды добавляют дрожжевой экстракт, сыворотку крови, витамины, углеводы. Наиболее часто используют жидкую и плотную среды Мартена, представляющие собой кислотный гидролизат фарша из свежих свиных желудков. Нередко применяют среду Эдварда, состоящую из отвара сердечной мышцы, воды, пептона, после стерилизации добавляют 20 % инактивированной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10 % дрожжевого экстракта. В питательные среды для первичной изоляции добавляют ингибиторы, тормозящие рост сопутствующей бактериальной микрофлоры: пенициллин, подавляющий рост грамположительных бактерий, но не действующий на микоплазмы; ацетат таллия, ингибирующий грамотрицательные бактерии. Посевы инкубируют при 37...38 °С.

В жидких питательных средах рост возбудителя в виде опалесценции различной интенсивности появляется на 2...3-и сутки. На плотных средах возбудитель формирует круглые с ровными краями колонии, напоминающие яичницу-глазунью, центр колонии в виде сосочка оптически более плотный, врастает в толщу среды (рис. 113). На кровяном агаре колонии окружены зоной альфа-гемолиза.

У выделенных культур изучают ферментативные свойства. Возбудитель ферментирует глюкозу, мальтозу, маннозу, галактозу, декстрин, образует сероводород, редуцирует хлорид тетразола, мочевины не расщепляет.

Для идентификации микоплазм предложена реакция иммунофлуоресценции. На поверхность агаровой среды в чашках засевают микоплазмы, чашки выдерживают в термостате 3...5 дней. Затем в них вносят 2 мл ФСБР на 30 мин, сливают и наносят на агар 2 мл меченой ФИТЦ-антисыворотки в рабочем титре (при непрямом методе применяют немеченую сыворотку), выдерживают при 37 °С 30 мин, сливают и трижды промывают буфером,

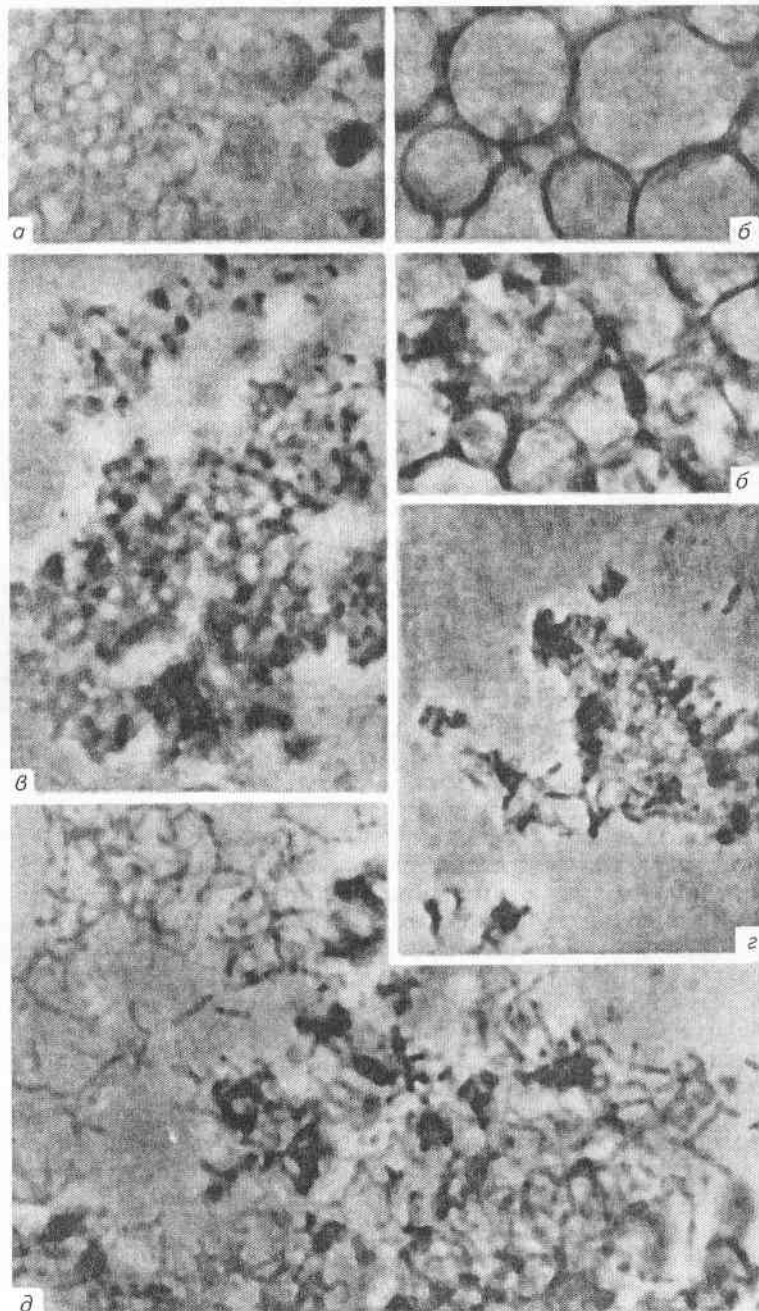


Рис. 112. Микроструктура разных видов микоплазм (×1350):

a — шаровидные тела различных размеров и разной оптической плотности; *б* — гигантские вакуолизованные тела; *в* — мелкие сферические формы *M. hominis* и не имеющие определенной формы тела; *г* — зернистые формы; *д* — ветвистые нитевидные формы и стрептококкоподобные формы

после чего просматривают колонии под люминесцентным микроскопом. Колонии, окрашенные гомологичной сывороткой, ярко флуоресцируют. Для изучения антигенной структуры микоплазм применяют реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП). При постановке реакции используют растворимый антиген, который получают путем многократного замораживания и оттаивания микоплазм (до 20 раз), воздействия ультразвуком (при 20 кГц — 3 мин) или детергентами (твин-20, додецилсульфат натрия).

Биопроба. Заражают двух-трех здоровых телят 6..8-месячного возраста подкожно в область подгрудка, интратрахеально или интраплеврально экссудатом от больных животных или культурой. За животными ведут наблюдение в течение 30 дней. В положительных случаях телята заболевают на 2..7-й день, температура поднимается до 40..41 °С, развивается общая интоксикация организма; при подкожном методе заражения в месте введения образуется флегмона, в процесс вовлекаются регионарные лимфоузлы. Гибель обычно наступает через 17 сут.

Серологическая диагностика включает в себя постановку РСК, РНГА, проведение ИФА. Для прижизненного выявления больных применяют РСК, которую ставят по обще-

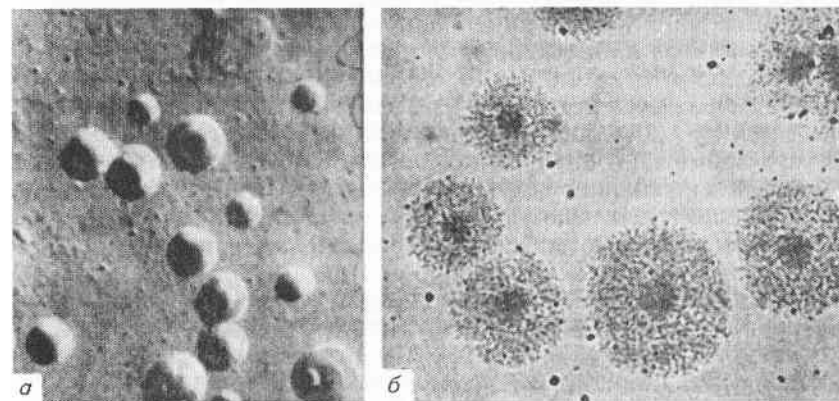


Рис. 113. Морфология колоний микоплазм:

a — *M. pneumoniae* (×120); *б* — *H. laidlawii* (×60)

принятой методике. Антиген для реакции готовят на биофабриках из плевральной жидкости от экспериментально зараженных животных; выпускают и культуральные антигены. В качестве диагностического теста используют реакцию непрямой гемагглютинации, чувствительность которой в острой фазе болезни выше, чем чувствительность РСК. Для определения специфических антител к микоплазмам в сыворотке крови животных применяют метод иммуноферментного анализа.

Инфекционная плевропневмония коз. Это контагиозное заболевание коз всех пород и возрастов. Характеризуется воспалением легких, плевры, серозным воспалением междолевой серозной ткани, скоплением экссудата в плевральной полости.

Возбудитель инфекционной плевропневмонии коз — *M. mycoides subsp. capri*, род *Mycoplasma*, семейство *Mycoplasmataceae*.

Лабораторная диагностика инфекционной плевропневмонии коз основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют сердце, легкие, бронхиальные и средостенные лимфатические узлы, экссудат грудной полости, печень, селезенку павших или вынужденно убитых животных. Экссудат из грудной полости набирают стерильным шприцем (2...5 мл). Для исследования пригоден свежий материал, который пересылают в лабораторию в стерильной посуде в термосе со льдом или в замороженном состоянии. Замороженный материал хранят не более 10 сут.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки фиксируют этанолом 15...20 мин, окрашивают при комнатной температуре в течение 24 ч краской Романовского—Гимзы, разведенной дистиллированной водой в соотношении 1 : 10, после чего промывают и микроскопируют. В положительных случаях обнаруживают мелкие полиморфные образования кокковидной, кольцевидной, нитевидной форм розового цвета. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдают грамотрицательно окрашенную аморфную массу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Для выделения культуры возбудителя инфекционной плевропневмонии коз применяют жидкие питательные среды Мартена, Эдварда и триптический перевар сердца крупного рогатого скота. Посевы помещают в термостат при 37...38 °С на 5...7 дней.

На жидких средах рост возбудителя проявляется незначительным помутнением или опалесценцией, на агаре — мелкими ро-

синчатыми колониями. Под малым увеличением микроскопа у них обнаруживают темный, растущий в агар центр и светлую периферийную зону. Колонии напоминают по внешнему виду яичницу-глазунью.

Возбудитель ферментирует глюкозу, маннозу, сахарозу, вызывает разжижение свернутой сыворотки и гидролиз желатины, фосфатазная активность не выражена.

Биопроба. Для подтверждения диагноза инфекционной плевропневмонии коз ставят биопробу на двух 6...12-месячных козлятах. Для заражения используют 3...4-суточную свежeweделенную культуру микоплазм или суспензию из исследуемого материала на физиологическом растворе (1 : 10). Козлят заражают внутриплеврально по 10 мл. В положительных случаях у животных через 2...15 дней отмечают повышение температуры тела, одышку. Гибель наступает через 1...3 нед. Из пораженных легких и плеврального экссудата выделяют культуру возбудителя.

Инфекционная агалактия овец и коз. Контагиозное заболевание. Характеризуется прекращением лактации, поражением молочной железы, глаз и суставов. У беременных животных проявляется абортami. Гибель животных при остром течении болезни наступает через 5...8 дней.

Возбудитель — микоплазма *M. agalactiae*, род *Mycoplasma*.

Лабораторная диагностика инфекционной агалактии мелкого рогатого скота основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и биопробы. При отрицательных результатах биопробы выделяют чистую культуру посевом на питательные среды и идентифицируют возбудитель по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материал для исследования. При заболевании вымени в лабораторию направляют молоко, при поражении суставов — синовиальную жидкость; от павших животных — паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженную часть вымени, пораженный глаз, синовиальную жидкость.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму и по Романовскому—Гимзе. В препаратах, окрашенных по Романовскому—Гимзе, в положительных случаях выявляют мелкие полиморфные образования розового цвета кокковидной, кольцевидной или нитевидной формы.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель растет на агаре и в бульоне Мартена с добавлением 15...20 % сыворотки лошади или крупного рогатого скота; на средах Эдварда и Хоттингера с добавлением сыворотки и 1...2 % лактозы, на триптическом переваре сердца крупного рогатого скота.

На жидких средах на 5...7-й день появляется слабая опалес-

ценция или незначительное помутнение. На плотных средах образуются мелкие колонии, напоминающие яичницу-глазунью (просматривают с помощью линзы). При отсутствии роста проводят не менее 5 последовательных пассажей с интервалом 5...7 дней. Отсутствие роста в 5...7-м пассажах указывает, что исследуемый материал не содержит возбудитель инфекционной агалактии мелкого рогатого скота. Микоплазмы также выращивают в клеточных культурах, используя клетки почки эмбриона овцы, куриные фибробласты.

M. agalactiae не ферментирует глюкозу и маннозу, не гидролизует аргинин и желатину, не разжижает свернутую сыворотку, обладает фосфатазной активностью.

Биопроба. Ставят на кроликах массой 2,5...3 кг или на животном того вида (овцы или козы 1...2-месячного возраста), от которого выделена культура. Для заражения используют суспензию исследуемого материала, обработанную ингибиторами (ацетат таллия и пенициллин), или чистую культуру микоплазм. Кроликов заражают введением в переднюю камеру глаза 0,1...0,2 мл материала с предварительным удалением тонкой иглой из камеры 0,1...0,05 мл жидкости. В другой глаз для контроля таким же образом вводят стерильный бульон. Через 5...12 дней в положительном случае у подопытных кроликов развивается кератит. Наблюдение ведут в течение 30 дней. При наличии кератита биопробу считают положительной, выделение культуры необязательно.

Овец и коз заражают, вводя материал в молочный канал, или подкожно по 5 мл, или в сустав по 2 мл. В положительных случаях через 2...30 дня после введения материала у животных развивается клиническая картина инфекционной агалактии мелкого рогатого скота.

Срок исследования без постановки биопробы 30 дней, с биопробой и последующим выделением возбудителя — до 90 дней.

Серологическая диагностика основана на результатах исследования сывороток в РСК.

Респираторный микоплазмоз птиц. Это контагиозная болезнь кур и индеек. Характеризуется поражением органов дыхания. У птиц развивается катаральный ринит с последующей одышкой, кашлем; катаральный ринит переходит в серозно-фибринозный, у некоторых птиц возникают конъюнктивит, синусит, припухлость в области межчелюстного пространства. Птица становится малоподвижной, оперение взъерошено, гребень бледный, снижаются приросты массы у молодняка и яйценоскость у несушек. У индеек типичный признак — воспаление подглазничных синусов. У взрослой птицы заболевание может протекать бессимптомно.

Возбудитель — *M. gallinarum*, род *Mycoplasma*.

Лабораторная диагностика респираторного микоплазмоза птиц основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Материал для исследования. От свежих трупов птиц берут соскобы со слизистых оболочек гортани, трахеи, головной мозг, а также кусочки легкого и стенки воздухоносных мешков. При отсутствии патологических изменений у взрослой птицы на исследование направляют легкие, желточный мешок, трахею эмбрионов последних дней инкубации и 1...2-суточных цыплят.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В мазках, окрашенных по методу Романовского—Гимзы, микоплазмы обнаруживают в виде мельчайших полиморфных коккобактерий фиолетового или голубого цвета, беспорядочно расположенных по всему полю зрения (рис. 114).

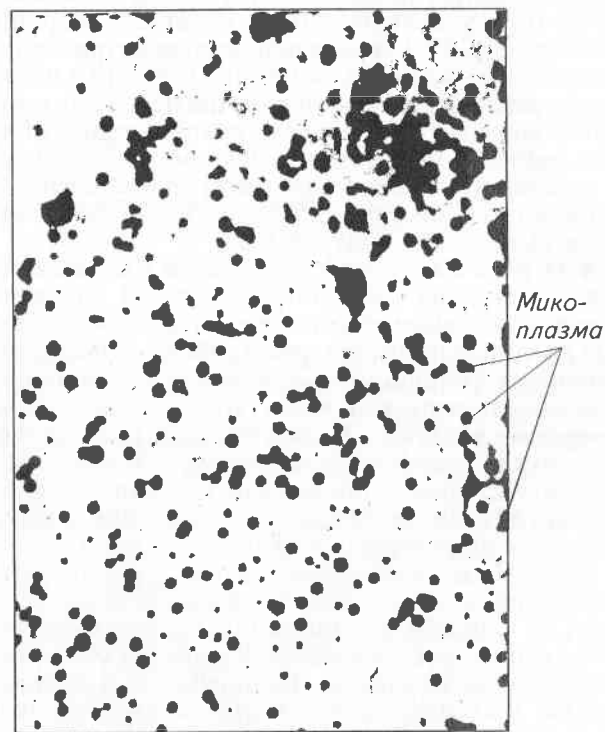


Рис. 114. *M. gallisepticum*. Препарат из трехсуточной культуры на жидкой питательной среде (×900)

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Посевы из исследуемого материала делают на среды Эдварда, Хоттингера, Мартена.

Рост возбудителя микоплазма на жидких средах характеризуется едва заметной опалесценцией или нежным помутнением среды. На плотных средах микоплазмы образуют круглые мелкие бесцветные колонии с гладкой или пуговчатой поверхностью, хорошо различимые при малом увеличении микроскопа. Для активизации роста микоплазм проводят не менее 5 пассажей с интервалами между посевами в 5 дней. Посевы инкубируют при температуре 37...38 °С.

Возбудитель микоплазма птиц утилизирует глюкозу, маннозу, мальтозу, образует аммиак, редко сероводород, индол. Не гидролизует желатину и аргинин, не обладает фосфатазной активностью, агглютинирует эритроциты птиц.

Биопроба. Для определения патогенности выделенных микоплазм куриные или индюшьи 9-дневные эмбрионы заражают в хорионлантоисную полость культурой на жидкой питательной среде по 0,2 мл. Используют не менее 15 эмбрионов. Яйца инкубируют при 38...40 °С и ежедневно просматривают в овоскопе. При вскрытии эмбрионов, погибших через 48 ч и позднее, отмечают дегенеративные изменения: артриты, отеки и кровоизлияния на коже головы, теле, лапках, застойные явления в паренхиматозных органах, пневмонию. Наличие возбудителя определяют при посевах на специальные питательные среды. Биопробу считают положительной при гибели не менее 50 % зараженных эмбрионов и выживании контрольных.

Серологическая диагностика включает в себя постановку следующих реакций: капельной агглютинации с цельной кровью или сывороткой крови; торможения геагглютинации (РТГА), ингибирования роста, РСК, а также применяют метод иммунофлуоресценции. Серологические методы диагностики микоплазма птиц еще недостаточно совершенны.

Биопрепараты. Антиген для диагностики респираторного микоплазма птиц (лиофилизированный) готовят из штамма *M. gallisepticum* S6. Антиген применяют в сывороточно-капельной реакции агглютинации на стекле для постановки эпизоотического диагноза на респираторный микоплазмоз птиц.

Риккетсиозы. Риккетсии относят к группе грамотрицательных бактерий — облигатных внутриклеточных паразитов. В зависимости от способа размножения их подразделяют на два порядка: *Rickettsiales* и *Chlamydiales*. В порядок *Rickettsiales* включено 3 семейства: Rickettsiaceae, Bartonellaceae и Anaplasmataceae.

В семейство Rickettsiaceae включены мелкие палочковидные и диплококковидные внутриклеточные микроорганизмы, чаще обитающие в тканях членистоногих, способные вызвать заболевание у животных и человека.

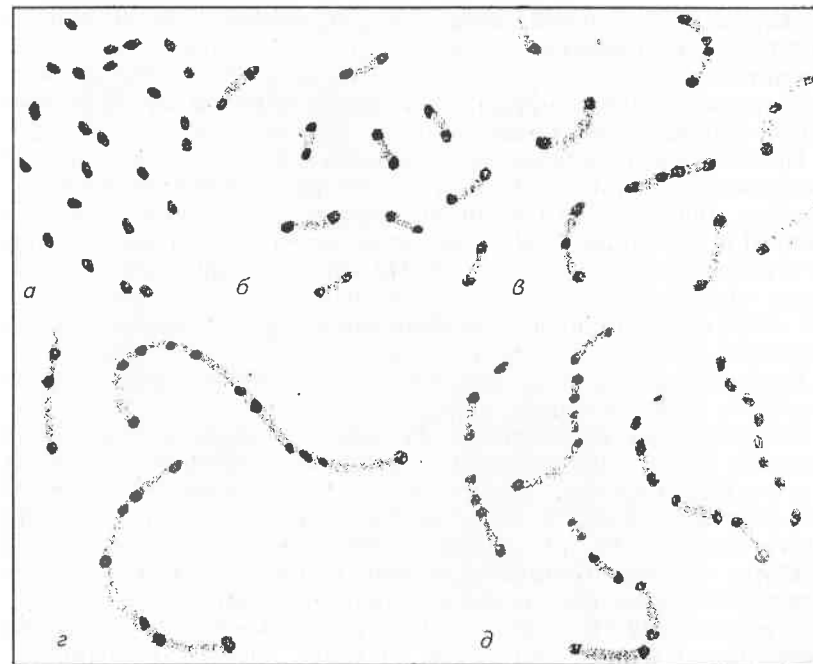


Рис. 115. Зарисовка риккетсий Провачека из препаратов, фиксированных по Буэну и окрашенных по Романовскому:

а — кокковидные формы; б, в — бациллярные формы; г — нитевидные формы; д — распад нитевидных форм

По морфологии различают четыре основных типа риккетсий: кокковидные (диаметр 0,3...1 мкм); палочковидные биполярные (1...1,5 мкм); удлинённые биполярные, часто изогнутые (3...4 мкм); нитевидные полизернистые (10...40 мкм) (рис. 115). Кокковидные формы окрашиваются по Романовскому—Гимзе и Цилю—Нильсену в красный цвет, палочковидные и нитевидные — в красно-голубой (зерна красные, цитоплазма между ними голубая); по Здродовскому — в красный. Метод Здродовского — облегченная модификация способа Циля—Нильсена (карболовый фуксин Циля разводят в следующем соотношении: 10...15 капель на 10 мл дважды дистиллированной воды или фосфатного буфера pH 7,4). Тонкослойный препарат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем, окрашивают разведенным фуксином в течение 5 мин. Затем промывают водой, быстро (1...3 с) обрабатывают кислотой (0,5%-й раствор лимонной, 0,15%-й раствор уксусной и др.), промывают водой и докрасивают 0,5%-м водным

раствором метиленовой сини 10 с, промывают, подсушивают фильтровальной бумагой.

Риккетсии размножаются делением. Вне организма развиваются только в культуре растущей и переживающей ткани, на оболочках куриных эмбрионов.

Ку-риккетсиоз (Ку-лихорадка) (от англ. *quegu* — сомнения, сомневаться). Природно-очаговая зооантропонозная болезнь домашних, промысловых и диких млекопитающих животных и птиц. Протекает чаще бессимптомно, но может встречаться также в острой и хронической формах. Клинические признаки болезни: повышение температуры, ринит, пневмония, конъюнктивит, поражение половых органов, маститы, у быков — орхиты, рождение нежизнеспособного потомства, аборт.

Возбудитель Ку-риккетсиоза — *Coxiella burneti*, род *Coxiella*, семейство Rickettsiaceae.

Лабораторная диагностика Ку-риккетсиоза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры методом биопробы и идентификацию возбудителя по морфологическим и серологическим свойствам.

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют кровь из вены; клещей, собранных с животных; выделения из матки и влагалища; плаценты от абортировавших животных; от павших и убитых с диагностической целью животных берут участки пораженного легкого, головного мозга, селезенки, паренхимы вымени, регионарные лимфоузлы.

Микроскопия препаратов из исходного материала. При микроскопии мазков, окрашенных по методам Романовского—Гимзы и Здродовского, можно обнаружить коккоподобные (диаметр 0,2...0,5 мкм), палочковидные (2 мкм) и нитевидные (10...12 мкм) формы, расположенные одиночно, попарно и короткими цепочками, которые могут находиться внутри клеток ткани и вне клеток. По методу Здродовского риккетсии будут красного цвета на голубом фоне, по Романовскому—Гимзе кокковидные формы красные; палочковидные и нитевидные красно-голубые (рис. 116).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Из исходного материала готовят суспензию на физиологическом растворе (1 : 10), в которую добавляют антибиотики и вводят 0,2...0,25 мл в желточный мешок 5...6-суточных куриных эмбрионов. Проводят 4...6 пассажей. При положительном результате отмечают отставание в развитии и гибель зараженных эмбрионов. Риккетсии обнаруживают микроскопически в мазках, приготовленных из оболочек желточного мешка. Иногда используют культуры клеток куриных и мышечных фибробластов.

Для обнаружения и идентификации возбудителя используют

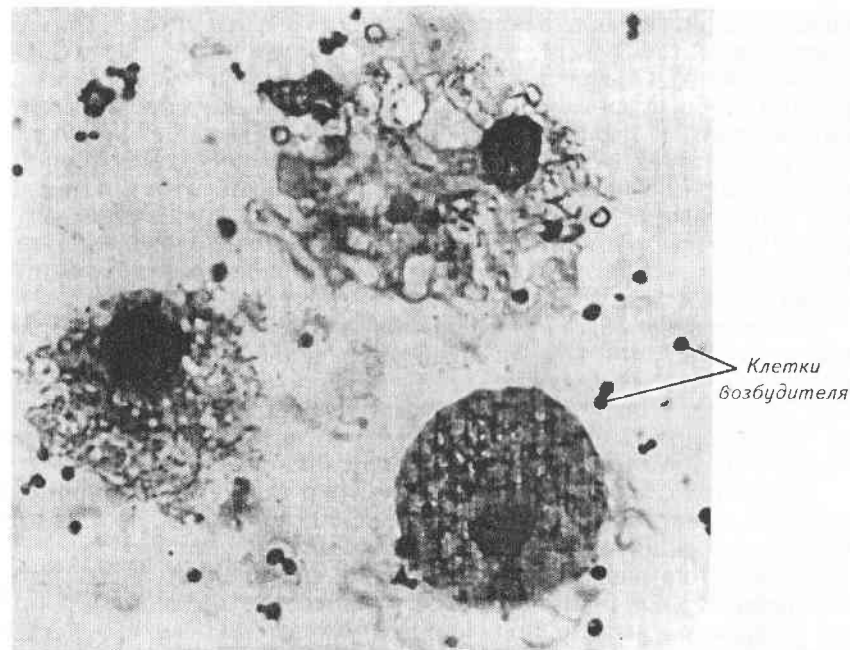


Рис. 116. *C. burneti* в мазке из гемолимфы клеща. Окраска по Романовскому—Гимзе ($\times 1000$)

реакцию иммунофлуоресценции, метод иммуноферментного анализа.

Биопроба. Для выделения риккетсий Бернета и подтверждения их патогенности заражают двух молодых морских свинок (массой 250...300 г) или четырех молодых белых мышей исходным материалом (суспензия на физиологическом растворе 1 : 5, обработанная антибиотиком) или эмбриональной культурой. Материал вводят внутривентриально свинкам по 3...5 мл и мышам по 0,5...1 мл. Для получения более четких результатов проводят от 3 до 5 «слепых» пассажей. В последних пассажах у морских свинок через 3...10 дней после заражения появляется лихорадка, и животные через 3...12 дней погибают, при вскрытии у них отмечают увеличение печени, селезенки и лимфоузлов.

Серологическая диагностика основана на результатах РСК, в которой исследуют сыворотки крови больных животных. При получении положительных результатов (на 3 и 4 креста) реакцию повторяют для подтверждения полученных данных.

Эрлихиоз собак. Это трансмиссивная лихорадочная болезнь. Характеризуется истощением, панцитопенией, геморрагиями на

коже и слизистых оболочках. Возбудитель — *E. canis*, род *Erlichia*, семейство Rickettsiaceae. Наиболее восприимчивы к эрлихиозу собак немецкая овчарка и гончая, болеют лисы, макаки-резус, койоты. Лабораторные животные (мыши, крысы, морские свинки, хомячки) и куриные эмбрионы нечувствительны. Морфогенез возбудителя складывается из превращения элементарного тельца овальной или кокковидной формы (0,4 мкм) в инициальное тельце неопределенной формы размером 1...2 мкм с последующей трансформацией в морулу (образования похожи на тутовую ягоду 2...4 мкм). Цикл развития завершается распадом морулы на элементарные тельца.

Лабораторная диагностика эрлихиоза собак заключается в световой микроскопии мазков крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе, для определения морул возбудителя в лейкоцитах собак. Морулы обнаруживают, начиная с третьей недели болезни на протяжении 2...5 лет. Все формы *E. canis* окрашиваются по Гимзе в голубой цвет, по Романовскому — в розовый.

Как метод серологической диагностики применяют непрямую реакцию иммунофлуоресценции с использованием зараженной культуры моноцитов в качестве антигена.

Эрлихиоз крупного и мелкого рогатого скота. Это трансмиссивная лихорадочная болезнь. У овец развиваются пневмонии, аборт, у баранов — бесплодие, у коров отмечают лихорадку, вялость, снижение удоев.

Возбудитель — *Erlichia phagocytophila*.

Лабораторная диагностика эрлихиоза крупного и мелкого рогатого скота основана на микроскопическом изучении окрашенных препаратов из материала. Морфологические и тинкториальные свойства возбудителя аналогичны *E. canis*.

Гидроперикардит (коудриоз). Это заболевание жвачных и всеядных животных. Характеризуется лихорадкой, геморрагическим диатезом с образованием серозного экссудата в грудной и брюшной полостях.

Возбудитель — *Cowdria ruminantum*, род *Cowdria*, семейство Rickettsiaceae.

Лабораторная диагностика гидроперикардита основана на микроскопическом изучении окрашенных препаратов и на результатах биопробы.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кровь от больного животного, костный мозг, селезенку.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В положительных случаях в окрашенных препаратах из материала обнаруживают кокковидные, эллипсоидные (0,2...0,5 мкм) или палочковидные клетки размером (0,2...0,3) × (0,4...0,5) мкм, расположенные в вакуолях цитоплазмы клеток эндотелия, где образуют специфические компактные колонии. По Граму окрашивается отрицательно, по Гимзе — в темно-синий цвет. Особенно важное

диагностическое значение имеет обнаружение возбудителя в эндотелии капилляров коры головного мозга.

Биопроба. Заражают естественно-восприимчивых животных путем внутривенного введения крови больного.

Хламидиозы. Возбудителей хламидиозов относят к порядку *Chlamydiales*, семейству Chlamydiaceae, включающему в себя один род *Chlamydia* с двумя видами: *C. trachomatis* и *C. psittaci*. Это грамотрицательные неподвижные кокковидные облигатные паразиты с выраженным полиморфизмом. *C. trachomatis* патогенен для человека и мышей, *C. psittaci* вызывает ряд инфекционных заболеваний у животных и птиц. Развитие патологического процесса зависит от места локализации возбудителя у животных. Хламидии чаще поражают респираторные органы и кишечный тракт у птиц, ягнят, телят, поросят, гениталии у крупного и мелкого рогатого скота, синовиальные ткани телят, поросят, ягнят, жеребят, слизистые оболочки глаз крупного рогатого скота, свиней, овец, кошек и др. Клинические проявления хламидиоза разнообразны: диарея, пневмонии, конъюнктивиты, полиартриты, перикардиты, энцефалиты, аборт, мертворождение, бесплодие, вагиниты, эндометриты и т. д. К *C. psittaci* восприимчивы дикие и домашние птицы — свыше 130 видов. Из домашних птиц чаще болеют утки, индейки, гуси, реже — куры, голуби (орнитоз).

Лабораторная диагностика хламидиозов основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры методом биопробы и идентификацию возбудителя по морфологическим свойствам.

Материал для исследования. От павших или вынужденно убитых животных в лабораторию направляют кусочки паренхиматозных органов; при аборте — плод целиком или паренхиматозные органы и сычуг; для прижизненной диагностики — пробы эякулята или замороженной спермы, кровь для серологических исследований. Материал берут в течение двух часов после гибели, убоя или аборта, помещают в термос со льдом.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Для световой микроскопии мазки из материала окрашивают по Романовскому—Гимзе (хламидии в зависимости от стадии развития окрашены в красно- или сине-фиолетовый цвет), Стемпу. При окраске по Стемпу препараты фиксируют нагреванием, окрашивают фуксином Циля, разведенным дистиллированной водой в соотношении 1 : 5 (рН 7,4) 15 мин, промывают дистиллированной водой, обрабатывают 0,05%-м раствором серной кислоты 1 мин, вновь промывают дистиллированной водой, докрашивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 30 с, после чего промывают

водой и микроскопируют: хламидии ярко-красные на зеленоватом фоне клеток. При иммунофлуоресцентном выявлении хламидий в материале используют прямой и непрямой варианты. В зависимости от этапа морфогенеза размеры хламидий варьируют от 0,2...0,4 до 0,6...1,5 мкм.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Для выделения хламидий используют 6...7-дневные куриные эмбрионы или лабораторных животных. Из материала готовят суспензию на физиологическом растворе (1 : 10), центрифугируют, надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина, 500 ЕД/мл стрептомицина) при 4 °С 24 ч, одновременно контролируя на стерильность. Затем исследуемый материал в объеме 0,2 мл вводят в желточный мешок. Эмбрионы инкубируют в термостате при 37 °С и относительной влажности 75 %. Эмбрионы, погибшие на 4...12-й день, вскрывают, аллантоисную жидкость контролируют на бактериальную контаминацию. Из желточных мешков готовят мазки-отпечатки и исследуют на наличие хламидий методом микроскопии. При отсутствии специфической гибели эмбрионы на 12-е сутки вскрывают и проводят второй пассаж, при необходимости — и третий.

Биопроба. Для выделения хламидий на лабораторных животных заражают пять белых мышей или две-три морские свинки. Материал, подготовленный ранее описанным способом, вводят внутрибрюшинно или интраторакально мышам по 0,3 мл, морским свинкам — по 0,5 мл. Наблюдение ведут в течение 10 сут. В положительных случаях животные погибают на 7...10-е сутки. При вскрытии обнаруживают большое количество серозно-фибринозного экссудата в грудной и брюшной полостях, очаговую пневмонию, кровоизлияния под легочной плеврой. При отсутствии гибели животных проводят слепые пассажи. Обнаружение и идентификацию хламидий проводят, как описано ранее.

Серологическая диагностика основана на результатах РСК или РДСК. Сыворотки исследуют в разведении 1 : 5 и 1 : 10, положительным считают задержку гемолиза на два—четыре креста в разведении 1 : 10, сомнительным — на один крест в разведении 1 : 10 и на один—четыре креста — в разведении 1 : 5.

Биопрепараты. Инактивированная эмульгированная вакцина против хламидиозного аборта овец.

Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Описать характер роста микоплазм на плотных и жидких питательных средах.
2. Промикроскопировать окрашенные препараты из культур микоплазм.

3. Окрасить и промикроскопировать мазки-отпечатки, содержащие хламидии.

4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические, тинкториальные и культуральные свойства микоплазм?
2. В чем заключается бактериологическая диагностика микоплазмозов?
3. На чем основана серологическая диагностика микоплазмозов?
4. Как классифицируют хламидии?
5. Какие методы применяют для лабораторной диагностики риккетсиозов и хламидиозов?

Тема 37

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ДЕРМАТОМИКОЗОВ, МИКОЗОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПЛЕСНЕВЫМИ И ДРОЖЖЕПОДОБНЫМИ ГРИБАМИ. БИОПРЕПАРАТЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов со свойствами возбудителей, методами микологического исследования и этапами лабораторной диагностики трихофитии, микроспории, аспергиллеза, пенициллиоза, мукоромикоза, кандидамикоза, эпизоотического лимфангита, кокцидиоидомикоза.

Оборудование и материалы. Материал от животных, пораженных трихофитией и микроспорией, культуры грибов рода *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida* на плотной питательной среде Сабуро или др., препаровальные иглы, микологические крючки, предметные и покровные стекла, смесь воды, спирта, глицерина (поровну), 20%-й раствор гидроксида натрия или гидроксида калия, 50%-й водный раствор глицерина, плакаты, таблицы, биопрепараты.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Микозы — группа болезней животных и человека, вызываемых патогенными микроскопическими грибами. Основные методы лабораторной диагностики этих болезней: микроскопия, выделение и идентификация грибов-возбудителей.

Дерматомикозы. Заболевания кожи и ее производных. Восприимчивы сельскохозяйственные животные всех видов (преимущественно молодняк), пушные и хищные звери. У людей инфицированию более подвержены дети. Важным фактором заражения служит мацерация кожи.

Возбудители дерматомикозов — грибы дерматофиты, принадлежат к высшим, несовершенным (класс *Deuteromycetes*) грибам, широко распространены в природе. Они паразитируют на орого-

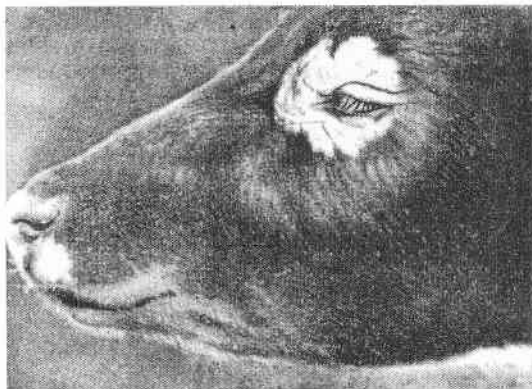


Рис. 117. Очаг поражения вокруг левого глаза и века у тельенка при трихофитии

вевших субстратах, выделяя кератиназу, разлагающую кератин эпидермиса, волос, ногтей. К дерматофитам относят представителей трех родов: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (более 40 видов). В быту трихофитию и микроспорию называют «стригущий лишай».

Трихофития. Инфекционное заболевание. Характеризуется появлением на коже округлых или овальных облысевших очагов с мягкими, иногда сухими корочками в области головы. Поражения могут распространяться по поверхности тела животного (рис. 117, 118).

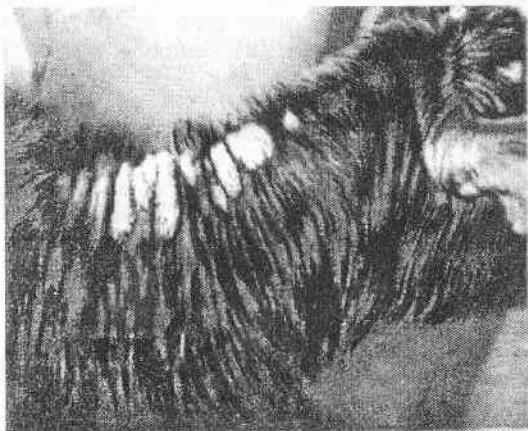


Рис. 118. Многочисленные поражения на шее у тельенка при трихофитии

При поверхностной форме размер повреждений 1...5 см в диаметре, иногда развиваются более обширные очаги. Корки легко отделяются вместе со склеенными волосами, под ними на слегка влажной поверхности кожи торчат обломавшиеся волосы, кое-где встречаются папулы и пузырьки.

При глубокой форме болезни наблюдают несколько очагов поражения с ярко выраженными экссудативными и воспалительными процессами, инфильтрацию, большое количество фолликулярных пустул. Встречаются множественные экссудативные поражения. Все очаги покрыты засохшим серозно-гнойным экссудатом. При удалении корок обнаруживают эрозии. Часто отмечают осложнения секундарной инфекцией.

Основные возбудители трихофитии: у крупного рогатого скота, буйволов, зебу, оленей — *T. verrucosum* (син. *T. faviforme*), реже *T. mentagrophytes*; у лошадей — *T. equinum* и *T. mentagrophytes*; у овец и коз — *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*; у свиней — *T. mentagrophytes*; у верблюдов — *T. verrucosum*, *T. sarkisovi*; у собак и кошек — *T. mentagrophytes* (кошки редко болеют трихофитией); у пушных зверей и кроликов — *T. mentagrophytes*, редко *T. verrucosum*; у лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, морские свинки) — *T. mentagrophytes*; у птиц — *T. gallinae*. Этот возбудитель известен давно как возбудитель парши (фавуса) преимущественно у рода куриных. Раньше болезнь называли «белый гребень».

Микроспория. Инфекционное заболевание кожи и ее производных. Появление очагов поражения сопровождается воспалительным процессом, обламыванием и выпадением волос, иногда наблюдают поражение ногтей.

Основные возбудители микроспории: у кошек и собак — *M. canis* (син. *M. lanosum*); у лошадей — *M. equinum*, редко *M. distortum* и *M. gypseum*; у свиней — *M. canis*; у пушных зверей, кроликов — *M. canis*; у лабораторных животных — *M. canis*; у крупного рогатого скота и овец — *M. canis* и *M. gypseum*. Микроспорией болеют дикие звери, а также животные зоопарков и цирков.

Лабораторная диагностика трихофитии и микроспории основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и люминесцентного анализа, выделение чистой культуры посевом на специальные питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют соскобы с пораженных частей тела животного вместе с корочками и чешуйками, пораженные волосы с участков, граничащих со здоровой кожей.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Чаще готовят неокрашенные (нативные) препараты. Исследуемый материал помещают в чашки Петри, измельчают ножницами и расщепляют с помощью скальпеля. Затем кусочки волос, чешуек, корочек переносят на предметное стекло, наносят каплю 10%-го раствора гидроксида натрия или гидроксида калия и слегка подогревают над пламенем горелки до отхождения паров. После этого добавляют каплю 50%-го водного раствора глицерина. На приготовленный препарат накладывают покровное стекло и просматривают сначала под малым увеличением сухого объектива ($\times 8$), затем с объективом $\times 40$ или с помощью иммерсионной системы.

С целью дифференциации грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum* учитывают характер расположения спор в пораженном волосе (рис. 119, 120) (цепочками или мозаичное), пользуясь следующими критериями:

Род *Trichophyton*

Гриб располагается снаружи или внутри пораженного волоска в виде рядов септированного мицелия. Споры округлые или овальные, располагаются цепочками, как и мицелий, вокруг или внутри волоса. В чешуйках и на ранних стадиях поражения встречается ветвящийся мицелий. Споры *T. verrucosum* и *T. equinum* более крупные, чем споры *T. mentagrophytes*

Род *Microsporum*

Споры мелкие (3...5 мкм), беспорядочно располагаются у основания волоска (иногда образуя чехлы) или на его поверхности. Споры резко преломляют свет и плотно прилегают друг к другу. Искривление мицелия и распад его на споры обуславливают характерное для микроспория мозаичное расположение спор. В чешуйках встречается ветвящийся мицелий

Люминесцентный анализ заключается в следующем. Исследуемый материал помещают в чашки Петри на расстоянии 20 см от ртутно-кварцевой лампы ПРК-2 или ПРК-4 с фильтром Вуда и просматривают под ультрафиолетовыми лучами в затемненном помещении. Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение. Корочки, чешуйки не светятся. Кроме того, с помощью люминесцентного анализа проводят раннюю диагностику атипичных и скрытых форм микроспории.

Обнаружение мицелия гриба и различных спор в материале — достаточное основание для постановки диагноза на дерматомикозы.

Выделение и идентификация культур возбудителей трихофитии и микроспории. Культуры выделяют в сомнительных случаях для подтверждения диагноза. Для получения чистой культуры грибов отдельные волосы или фрагменты кожи, корочки высевают на специальные питательные среды — агар Сабуро, сусло-агар, МПА, содержащий 2% глюкозы, агар Чапека и некоторые другие. Чтобы освободить исследуемый материал от сопутствующей микрофлоры, перед посевом на питательные среды его обрабатывают 60%-м этанолом в течение 5...7 мин, а затем дважды отмывают дистиллированной водой и подсушивают в термостате при 37 °С, или же в питательные среды добавляют антибиотики

Цепочки спор трихофитона

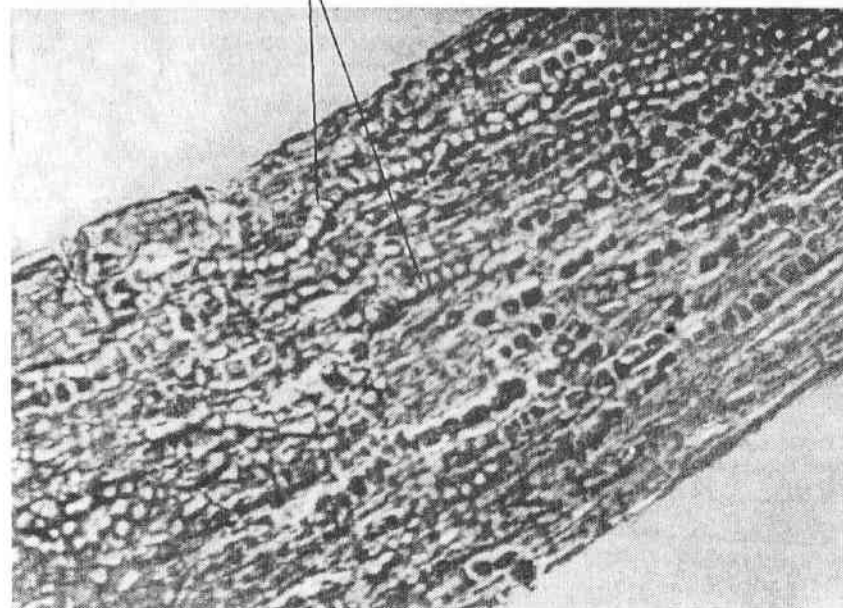


Рис. 119. Волос коровы, пораженный трихофитом



Споры *M. canis*

Рис. 120. Препарат из волоса собаки, пораженного микроспорией

(пенициллин, стрептомицин и др.) из расчета 100...200 ЕД/мл. Посевы инкубируют при температуре 26...28 °С 20...30 сут и более. У выросших культур грибов изучают культуральные и морфологические свойства. Готовят препараты «раздавленная капля» (см. тему 5) и микроскопируют. При идентификации видов грибов руководствуются признаками, изложенными в таблице 35.

35. Дифференциальные культуральные и морфологические признаки грибов-дерматофитов

| Время появления колоний | Характеристика колоний | Вегетативная и репродуктивная структура грибов |
|---|--|---|
| <i>T. verrucosum</i> (син. <i>T. faviforme</i>) 30...40 дней | Плотные, возвышающиеся над средой, кожистые, складчатые колонии серовато-белого цвета, глубоко врастают в среду; могут быть без обильных складок | Септированный мицелий, средней артростор, отдельные колонии серовато-белого цвета, глубоко врастают в среду; иногда овальной, грушевидной и палочковидной форм. В отдельных штаммах макроконидии из 2...8 сегментов |
| <i>T. mentagrophytes</i> (син. <i>T. gypseum</i>) 3...4 дня | Колонии плоские, ровные, приподнятые в центре в виде маленького бугорка. Поверхность мучнистая. Молодые культуры белые, с возрастом желтеют, могут врастать в среду с многочисленными радиальными лучами. Обратная сторона пигментирована: темно-красного, вишневого цвета | Гифы образуют типичные спирали. Вдоль гиф по боковым микрочленикам множество округлой формы макроконидий с 3...8 перегородками |
| <i>T. equinum</i> 6...9 дней | На сусло-агаре белые бархатистые колонии с выраженными радиальными бороздками. Обратная сторона желтая | Мицелий ветвящийся, множество округлых или грушевидных микроконидий. Большое количество рудиментарных микроконидий из 2...4 сегментов. Хламидоспоры единичные или отсутствуют |
| <i>T. sarkisovi</i> | На сусло-агаре пушистые, ровные или кожистые, бугристые или складчатые колонии, врастают в питательную среду | Одиночные микроконидии овальной формы, хламидоспоры одиночные или цепочками |
| <i>T. gallinae</i> | Молодые колонии гладкие, бархатистые, белого цвета. С возрастом складчатые, мучнистые, поверхность растрескивается. Иногда колонии розового или малинового цвета | Мицелий септированный. Много микроконидий. Обнаруживают макроконидии с 2...6 перегородками. В старых культурах — хламидоспоры |
| <i>M. canis</i> (син. <i>M. lanosum</i>) 2...4 дня | Первичные колонии плоские, сероватого или коричневого цвета с паутинистым растущим краем. Обратная сторона желтоватого цвета. При пересевах культура приобретает устойчивую белую окраску | Мицелий ветвящийся, разной ширины, иногда с ракетообразными гифами. Много макроконидий веретенообразной формы с 5...12 перегородками. Обнаруживают микроконидии (алеиспоры) округлой или овальной формы |

Продолжение

| Время появления колоний | Характеристика колоний | Вегетативная и репродуктивная структура грибов |
|---------------------------------|--|---|
| <i>M. equinum</i> 6...8 дней | На сусло-агаре формирует кожистые складчатые колонии, ровный, с возрастом утолщающиеся и принимает четкообразцелием. Глубоко врастает в питательную среду. Отдельные штаммы образуют кожистые терминальные колонии желтоватого или коричневого цвета без воздушно-клеточные перегородками; редко радиальных борозд, сходящихся в центре, у старых колоний кратерообразное углубление | Мицелий ветвящийся, селитчатый и принимает четкообразцелием. Глубоко врастает в питательную среду. Иногда обнаруживают многочисленные макроконидии с 5...7 перегородками; редко радиальных борозд, сходящихся в центре, у старых колоний кратерообразное углубление |
| <i>M. gypseum</i> | На сусло-агаре формирует плоские слегка желтоватые, тобушеобразными утолщениями. Множество макроконидий с закругленными концами и 3...6 перегородками. Обнаруживают хламидоспоры и много микроконидий | Мицелий ветвящийся, с раке-тообразными утолщениями. Множество макроконидий с закругленными концами и 3...6 перегородками. Обнаруживают хламидоспоры и много микроконидий |

Биопрепараты. Препарат ТФ-130 (ВИЭВ) и сухая вакцина ЛТФ-130 (ВИЭВ) против трихофитии крупного рогатого скота содержат аттенуированный штамм *Trichophyton verrucosum* (*faviforme*).

Вакцина СП-I против трихофитии лошадей из штамма *Trichophyton equinum*.

Вакцина Триховис (ВИЭВ) сухая против трихофитии овец из штамма *Trichophyton verrucosum* (вариант автотрофикум).

Вакцину МЕНТАВАК против трихофитии пушных зверей и кроликов готовят из культуры *Trichophyton mentagrophytes*.

Вакцина Камелвак-ТС против трихофитии верблюдов содержит аттенуированный штамм гриба *Trichophyton sarkisovi*.

Вакцина МИКОЛАМ против трихофитии и микроспории плотоядных животных, нутрий и кроликов.

Поливак-ТМ — инактивированная вакцина против дерматофитозов собак, включая 8 видов и разновидностей грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum*.

Вакцина ВАКДЕРМ против дерматофитозов животных предназначена для борьбы с микроспорией и трихофитией собак, кошек, пушных зверей и кроликов. Готовят из высокоиммуногенных штаммов *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* и *Trichophyton mentagrophytes*.

Аспергиллез. Заболевание домашних и диких птиц, пчел, редко млекопитающих (крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, лошади); восприимчив человек. Характеризуется гранулематозным

поражением органов дыхания, в основном легких, нередко абортми. В легких при размножении возбудителя формируется аспергиллома. Аспергиллома (аспергиллезная мицетомма) — шарообразная масса мицелия диаметром до 2 см (обычно *Aspergillus fumigatus*) и клеточного детрита, заполняющая полости легкого, образовавшиеся вследствие разрушения ткани. В отечественной практике этим термином обозначают любую инфекционную гранулему, вызванную видами *Aspergillus*.

Возбудители аспергиллеза принадлежат к высшим несовершенным грибам класса *Deuteromycetes*, рода *Aspergillus*, группе головчатых плесеней. Основные возбудители аспергиллеза животных — *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*.

Лабораторная диагностика аспергиллеза основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют свежие трупы мелких животных, наложения, узелки, пораженные органы или их кусочки, мокроту, яйца.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Непосредственное обнаружение гриба в неокрашенном или окрашенном препарате имеет значение лишь для предварительного диагноза. При этом выявление характерных для аспергиллов органов плодоношения особенно ценно и значительно ускоряет лабораторную диагностику. Исследуемый материал помещают в смесь этанола с глицерином и водой поровну или в физиологический раствор. Препараты микроскопируют, как описано в теме 5, ориентируясь на обнаружение органов плодоношения (рис. 121) — головка, стеригмы со спорами (см. тему 5).

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Для посева используют агар Чапека, Сабуро, кровяной, мозговой, кукурузный агары, МПА (рН 5,5...6,5). Гранулематозную ткань обжигают над пламенем, вырезают стерильно кусочки из середины и раскладывают их на плотную среду в чашки Петри, а экссудат засевают в пробирки со средой, инкубируют при 25 и 37 °С. На 3...5-е сутки на плотных средах образуются характерные для аспергилл колонии (рис. 122...124).

A. fumigatus на агаре Чапека образует разрастающиеся колонии — ровные или шероховатые. Развитый воздушный мицелий придает им войлочный вид белого цвета или, позднее, зеленого. Зрелые культуры в стадии спороношения черного цвета. С обратной стороны колонии бесцветны или желтовато-коричневого цвета. Межвидовая дифференциальная диагностика основана на различиях в строении стеригм и конидий.

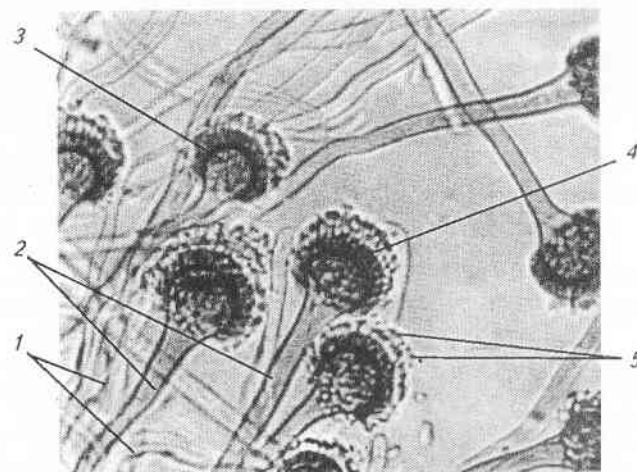


Рис. 121. Трехдневная культура *A. fumigatus*:

1 — мицелий; 2 — конидиеносцы; 3 — головка; 4 — стеригмы; 5 — споры

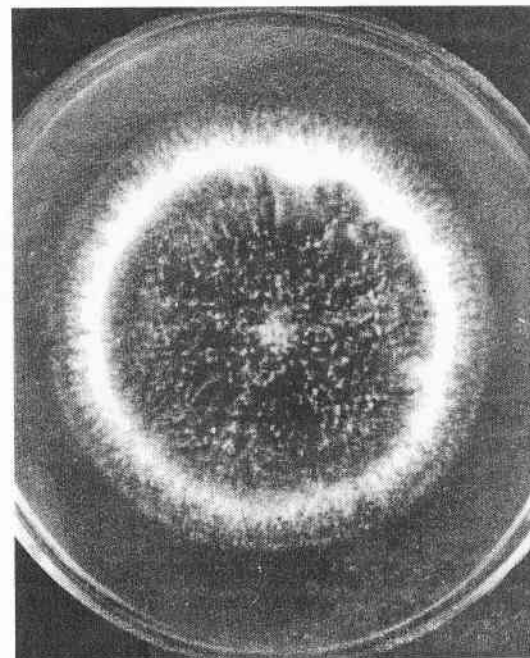


Рис. 122. Трехдневная колония *A. fumigatus* на агаре Чапека. Рост при 35 °С

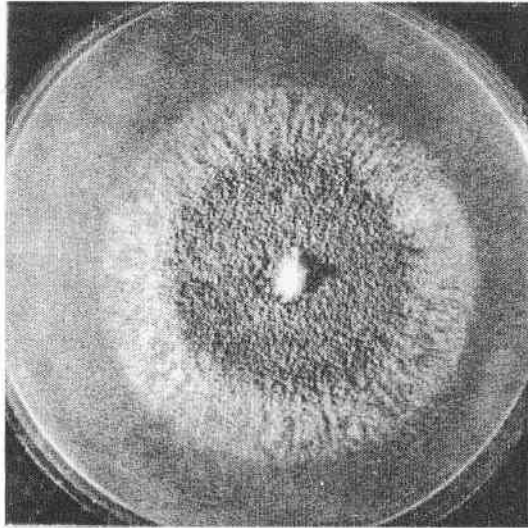


Рис. 123. Семидневная колония *A. flavus* на агаре Чапека, зернистая от образовавшихся спорных головок. Рост при 30 °С

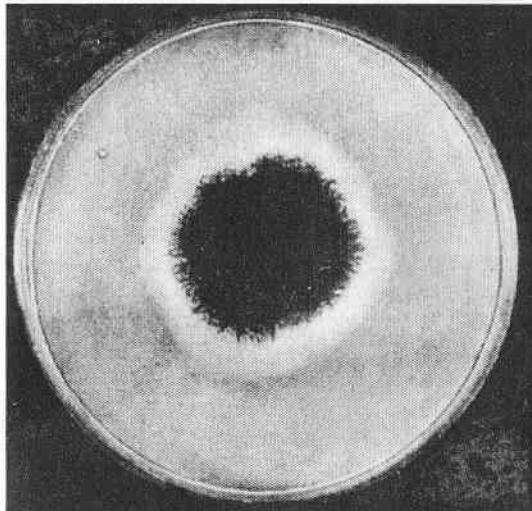


Рис. 124. Колония *A. niger* на агаре Чапека

В препаратах из культуры можно обнаружить гладкие, короткие, зеленого цвета конидиеносцы. Воздушные гифы бывают септированы и без перегородок. Колбообразные вздутия, содержащие споры, находятся только в верхней части гифов. У стеригм одноярусное строение. Конидии темно-зеленого цвета, округлые, шиповатые или полушаровидной формы.

A. flavus, *A. niger* на агаре Чапека формируют широко разрастающиеся колонии с обильным спороношением. Цвет колонии зависит от массы конидий, развивающихся на конидиеносцах. При микроскопии культур обнаруживают бесцветный или светлоокрашенный септированный мицелий. Часто образуются склероции шаровидной формы, представленные толстостенными клетками.

Биопроба. Метод применяют для подтверждения патогенности выделенных культур аспергилл. Кроликам, морским свинкам или белым мышам вводят внутривенно суспензию спор грибов $(0,5...1) \cdot 10^6$, что вызывает развитие генерализованного процесса с типичным поражением органов дыхания, почек, сердца. При вскрытии в этих органах обнаруживают множество мелких узелков с интенсивным развитием гриба.

Птице скармливают корм, зараженный спорами аспергилла, или проводят ингаляцию спор в дыхательный аппарат.

С помощью микологических исследований дифференцируют аспергиллез от микозов, вызванных другими плесневыми грибами.

Пенициллиомикоз. Заболевание многих видов животных, возникающее на фоне снижения общей резистентности организма и характеризующееся поражением кожи, слизистых оболочек.

Основные возбудители пенициллиомикоза — грибы рода *Penicillium*: *P. crustosum*, *P. glaucum*, *P. mycetomagenum*.

Лабораторная диагностика пенициллиомикоза основана на результатах микологического исследования. Диагностика данного микоза затруднена в связи с тем, что грибы рода *Penicillium* часто выделяют из легких и других тканей при туберкулезе и других инфекциях. Важным признаком для подтверждения диагноза служит обнаружение в очаге поражения элементов гриба, фагоцитированных макрофагами.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пораженные участки кожи, слизистых оболочек, пораженные органы и ткани от трупов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Препараты «раздавленная капля» исследуют под микроскопом в окрашен-

ном (по методам Грама, Циля—Нильсена и др.) и неокрашенном виде.

Важным диагностическим признаком служит обнаружение в нативных препаратах септированного мицелия и конидиеносцев, ветвящихся на вершине один или несколько раз в виде кисточки.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Материал высевает на сусло-агар, агары Чапека, Сабуро и др. и культивируют так же, как и возбудителей аспергиллеза и мукоромикоза. У выделенных культур грибов изучают морфологию колоний и внутреннюю структуру (табл. 36).

36. Основные дифференциальные признаки видов рода *Penicillium*

| Вид гриба | Морфология колоний | Морфология грибов |
|-----------------------|--|--|
| <i>P. crustosum</i> | Плоские бархатистые колонии | Кисточки двух-, трех- и многомутовчатые. Конидии круглые или эллиптические |
| <i>P. glaucum</i> | Быстрорастущие светло-голубые или зеленые радиально-бороздчатые колонии | Одиночные конидиеносцы с одно- или многомутовчатыми кисточками |
| <i>P. mycetogenum</i> | Темно-зеленые с диффузным пигментом пушистые колонии, окрашивающие среду в черный цвет | Мицелий с конидиеносцами, на конце которых одно-, двух-, или трехмутовчатые кисточки. Хламидоспоры желтовато-серые |

Биопроба. Заражают кроликов, морских свинок, крыс, белых мышей подкожно. На месте введения культуры грибов-возбудителей развивается абсцесс и формируется грануляционная ткань. При внутрибрюшинном и внутривенном введении развивается генерализованный процесс.

Мукоромикозы (мукорозы). Хронические заболевания, вызываемые плесневыми грибами. Характеризуются развитием гранулематозного процесса, сходного с туберкулезом, в лимфатических узлах и в легких, реже в других органах и тканях (кожа, ногти, слизистые покровы, пищеварительный тракт, центральная нервная система, мозг). К возбудителю мукороза восприимчивы свиньи, лошади, крупный рогатый скот, овцы, пушные звери; из лабораторных животных — морские свинки, мыши; болеют обезьяны, тюлени. Мукорозы людей встречаются в виде спорадических случаев.

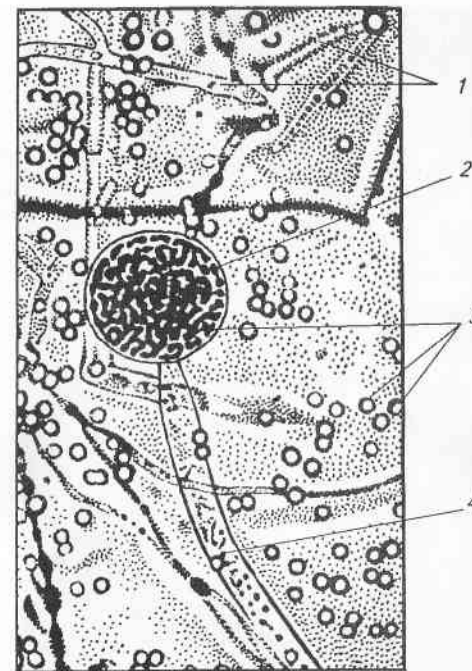
Основные возбудители мукоромикоза — грибы видов *Mucor mucedo*, *M. racemosus*, *Rhizopus nigricans* и др.

Лабораторная диагностика мукоромикоза основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на

Рис. 125. Четырехдневная культура *Mucor racemosus* на агаре Чапека:

1 — мицелий; 2 — спорангия; 3 — спорангиоспоры внутри спорангии и вне ее; 4 — спорангиеносец



питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. Объектом исследования служат некротизированные ткани, гной, экссудат, гранулематозные ткани и др.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В препаратах из исследуемого материала в положительных случаях обнаруживают несептированный мицелий. В круглых спорангиях на спорангиеносце видны эндоспоры (рис. 125). Для старого мицелия характерно присутствие хламидоспор.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Гранулематозную ткань обжигают над пламенем горелки и стерильно вырезают из середины кусочки, которые раскладывают на поверхности среды Чапека (в чашках Петри) или других сред. Посевы инкубируют при 25...30 °С. Культуры грибов довольно крупные, активно развиваются на искусственных питательных средах. На третьи сутки приобретают вид войлочных клочковатых серовато-белых колоний (рис. 126), в последующем цвет может изменяться до коричневого или бурого.

Биопроба. Метод применяют для изучения патогенности выделенных из исходного материала культур гриба. Кроликам, морским свинкам и белым мышам вводят внутривенно, внутримышечно или внутрибрюшинно смыв спор и мицелия чистых культур. Гриб развивается во всех внутренних органах и тканях. Кролики погибают через 15...20 дней после внутривенного заражения, мыши — через 5...15 дней. Чаще поражаются почки, реже печень, сердце, селезенка (абсцессы, некроз эпителия канальцев, разрастание грануляционной ткани).

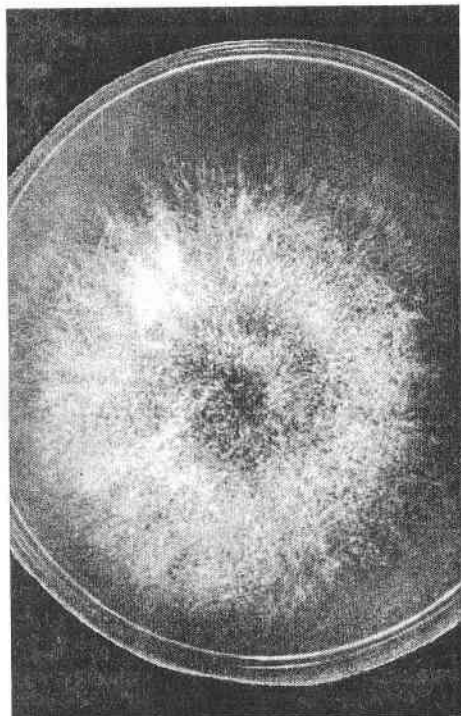


Рис. 126. Войлочно-кучковатая серовато-белая колония двухдневной культуры *M. racemosus* на агаре Чапека

Кандидамикоз (кандидоз, молочница и др.). Заболевание животных и человека. Характеризуется поверхностным поражением кожи, слизистых оболочек ротовой полости, наружных мочеполовых органов. Возбудитель также вызывает висцеральный микоз с поражением дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, молочной железы, мышечной, костной и сердечно-сосудистой систем, органов зрения. При генерализации кандидамикозного процесса могут поражаться многие органы одновременно (рис. 127). Следствием кандидамикоза у коров

могут быть маститы, эндометриты и аборт.

Основные возбудители кандидамикоза — *C. albicans* и *C. tropicalis*, реже *C. krusei*, род *Candida*, класс *Deuteromycetes*. Они широко распространены в природе. Наиболее часто их выделяют с поверхности различных фруктов, ягод, овощей. *Candida albicans* и др. входят в состав нормальной микрофлоры организма человека

и животных. Любые нарушения функций иммунокомпетентных клеток или нормального микробного ценоза приводят к возникновению заболевания. *C. albicans* в основном поражает птиц, кур, гусей,

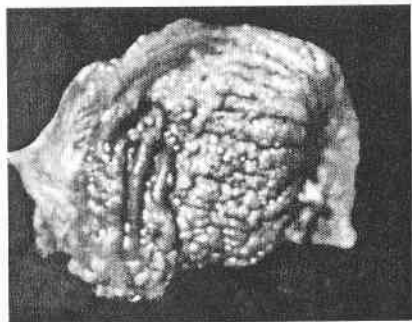


Рис. 127. Серовато-белые мелкие узелки на слизистой зоба цесаренка, павшего от кандидамикоза

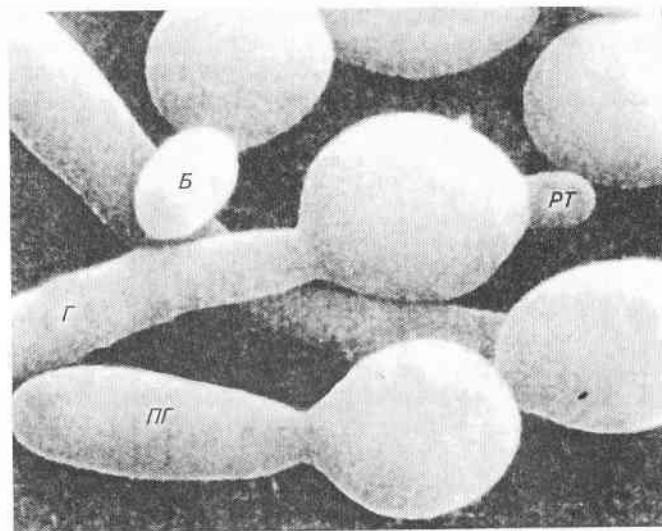


Рис. 128. Клетки *Candida albicans* (электронная микрофотография): ПГ — псевдогифы; Г — гифы; РТ — ростовые трубки; Б — бластоспора

уток, цесарок, индеек, голубей, фазанов и др. Более тяжело болеют поросята, телята, ягнята, щенки.

Лабораторная диагностика кандидамикоза основана на результатах микологического исследования.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материал для исследования. Объектом исследования служат пленки, наложения, соскобы со слизистой оболочки, содержимое язв и эрозий, кусочки внутренних органов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. В тканях животных *C. albicans* может образовывать дрожжевые клетки и гифы, обнаружение которых имеет диагностическое значение (рис. 128). Клеточная стенка мицелия в этом случае состоит из трех слоев и значительно уступает по толщине пяти-семислойной структуре дрожжевых клеток.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Материал (кроме внутренних органов) берут стерильной бактериологической петлей и тщательно растирают петлей или стеклянным шпателем по поверхности среды. Кусочки печени, селезенки или почек погружают в спирт, обжигают над пламенем спиртовки, а за-

тем из глубины органов вырезают кусочек ткани и проводят им по поверхности плотной среды. Кровь из сердца, содержимое желудка и кишечника, почечной лоханки высевают на агар Сабу-ро в чашки Петри. Посевы инкубируют при 37° 24...48 ч до появления на питательной среде колоний (рис. 129, 130).

Идентификацию культур грибов проводят в два этапа.

На первом этапе изучают культурально-морфологические признаки выделенной культуры в первичном посеве на плотной питательной среде (агар Сабу-ро, МПА с глюкозой) (табл. 37).

37. Основные дифференциальные признаки грибов рода *Candida*

| Вид гриба | Возраст культуры | Морфология колоний на агаре Сабу-ро | Морфология клеток |
|----------------------|------------------|--|--|
| <i>C. albicans</i> | 24...48 ч | Выпуклые белые или кремовые, сметанообразной консистенции, с гладкой блестящей поверхностью и ровными краями | Овальные или округлые дрожжевидные клетки |
| | 5...10 сут | Поверхность колоний гладкая матовая, края ровные или волнистые без выростов | Клетки с небольшими вакуолями, с элементами псевдомицелия |
| <i>C. tropicalis</i> | 24...48 ч | Колонии белого или серого цвета, с ровными краями, гладкой или слегка морщинистой поверхностью | Овальные клетки с хорошо заметными ядрами в неокрашенных препаратах и крупными вакуолями, видны отдельные нити псевдомицелия. Позднее (на 3...5-е сутки) обнаруживают сильно удлиненные клетки псевдомицелия, окружающие колонию |
| <i>C. krusei</i> | 3...5 сут | Колонии серые плоские, матовые или морщинистые, с зубчатыми или волнистыми краями | На 3...5-е сутки культивирования обнаруживают ветвистый псевдомицелий, врастающий в среду. Преобладают овальные удлиненные клетки с мелкими ядрами и крупными вакуолями |

На втором этапе для окончательной идентификации грибов рода *Candida* выделенную культуру высевают на жидкие питательные среды (бульон Сабу-ро, картофельный, кукурузный агары или на аналогичные жидкие среды — кукурузный или картофельный отвар) и определяют культуральные признаки и цитоморфологические особенности. Посев на картофельный и кукурузный агары делают штрихом в толщу среды, разрезая петлей поверхность агара. При микроскопии учитывают наличие псевдомице-

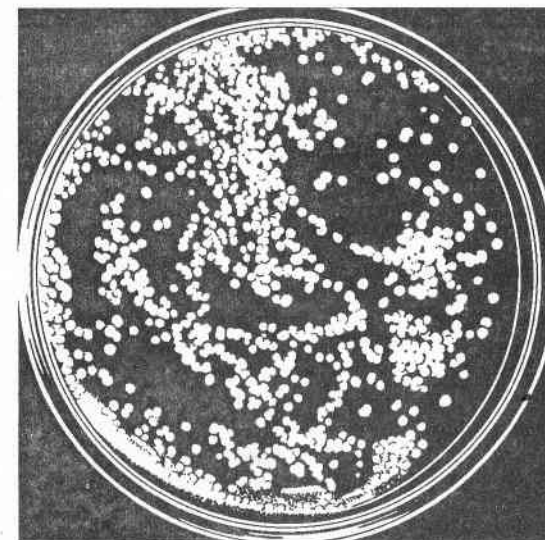


Рис. 129. *Candida albicans* на сусло-агаре в чашке Петри. Рост колонии на 2-е сутки при 28...30 °С

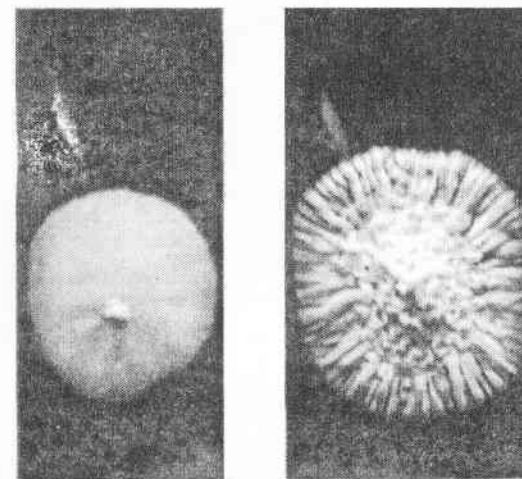


Рис. 130. Колонии *Candida* на сусло-агаре на 17-е сутки:

слева — S-форма *C. albicans*; справа — R-форма *C. tropicalis*

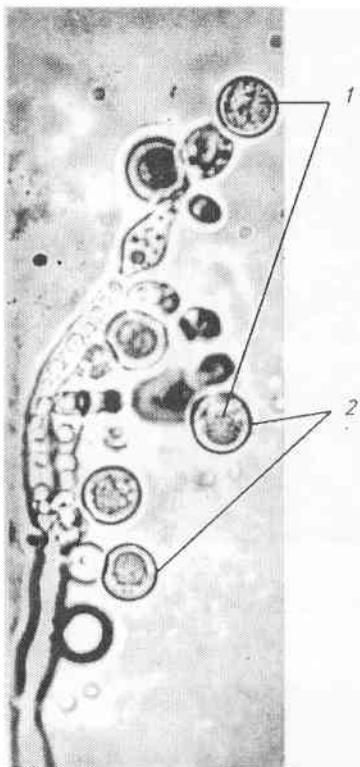


Рис. 131. Пятидневная культура *C. albicans* на кукурузном агаре:

1 — шаровидные хламидоспоры; 2 — контурная оболочка хламидоспоры

лия, тип роста на этих средах; присутствие хламидоспор на кукурузном агаре в чашках Петри исследуют при малом увеличении (рис. 131).

На жидких питательных средах грибы *C. albicans* через 24...48 ч вызывают помутнение среды и образование рыхлого осадка на дне пробирки. Для грибов *C. tropicalis* и *C. krusei* характерны глубинный рост и образование пленки и пристеночного кольца.

Для дифференциации видов грибов рода *Candida* определяют ферментативную активность на жидких средах Гисса, содержащих 3% различных углеводов и индикатор Андрее. Посевы наблюдают в течение 10...15 дней, учитывают кислото- и газообразование. Ферментативные свойства приведены в таблице 38.

38. Ферментативная активность грибов рода *Candida*

| Вид гриба | Углеводы | | | |
|----------------------|----------|----------|----------|---------|
| | глюкоза | мальтоза | сахароза | лактоза |
| <i>C. albicans</i> | КГ | КГ | (К) | — |
| <i>C. tropicalis</i> | КГ | КГ | КГ | — |
| <i>C. krusei</i> | КГ | — | — | — |

Примечание: К — кислотообразование; Г — газообразование; (К) — кислотообразование постоянное.

Эпизоотический лимфангит (бластомикоз, африканский сап). Хроническое заболевание животных. Характеризуется поражением лимфатических узлов, лимфатических сосудов и подкожной клетчатки с образованием язв, абсцессов и узелков. В отличие от дерматомикозов поражены более глубокие слои кожи. Болеют однокопытные животные: лошади, мулы, ослы, зарегистри-

рованы случаи заболевания этим микозом парнокопытных — верблюдов и КРС (рис. 132).

Возбудитель эпизоотического лимфангита — *Histoplasma farciminosus* (син. *Cryptococcus farciminosus*). Классификация криптококка неясна: одни исследователи причисляют его к бластомицетам, другие на основании некоторых биологических данных — к несовершенным грибам.

Лабораторная диагностика эпизоотического лимфангита основана на результатах микологического и серологического исследований.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя при микроскопии препаратов-отпечатков из исходного материала, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют содержимое абсцессов, гнойный экссудат язв.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Готовят препарат «раздавленная капля». Чаще микроскопируют неокрашенный препарат или красят по Граму или Романовскому—Гимзе. Благодаря окраске гранулы в цитоплазме хорошо различимы. Возбудителя эпизоотического лимфангита относят к дрожжеподобным грибам. В исследуемом материале обнаруживают крип-

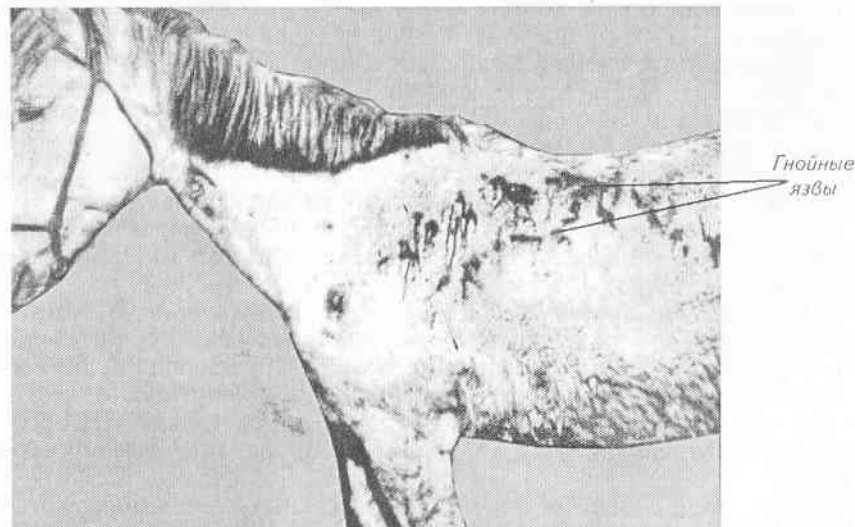


Рис. 132. Клиническая картина эпизоотического лимфангита у лошади, зараженной культурой *H. farciminosus* спустя три месяца

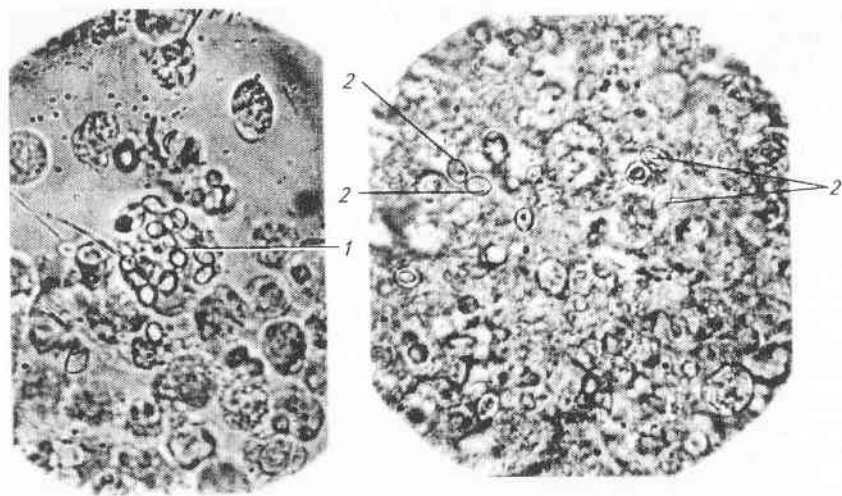


Рис. 133. Криптококки *H. farciminosum* в гное больной лошади:

1 — зафагоцитированные макрофагом; 2 — свободные

токкокки — клетки яйцевидной или лимоннообразной формы с четко выраженной двухконтурной оболочкой, клетки заострены на одном или обоих концах. Размеры криптококков 3...5 мкм в длину и 2...3,5 мкм в ширину. В гное находят по 2...3 криптококка, соединенных своими полюсами и иногда образующих цепочки (рис. 133). Часть криптококков можно найти в лейкоцитах (нейтрофилах и макрофагах). Центральная часть криптококков представляет собой гомогенное, полужидкое вещество, содержащее одно или несколько (2...4) блестящих зернышек, которые находятся в непрерывном и оживленном движении.

Необходимо учитывать, что для *H. farciminosus* характерен диморфизм, т. е. морфология гриба в патологическом материале и в культуре различна.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. В сомнительных случаях микроскопии материал высевают на питательные среды. Первичное выделение гриба затруднительно, но выделенную культуру удается поддерживать сравнительно легко. Гриб выращивают на МППА, глюкозно-глицериновом МПА (содержание углеводов 2...2,5%), агаре Сабуро при температуре 25...30 °С.

Через 10...12 дней на плотных питательных средах образуются колонии, сначала мелкие, в последующем более крупные, возвышающиеся над поверхностью среды. Колонии складчатые, сухие, кремового, а позднее коричневого цвета. В мазках из культуры

дрожжевые клетки не обнаруживают. Вне живого организма гриб развивается в мицелиальной форме. Мицелий септированный, ветвящийся, многоклеточный.

Серологическая диагностика основана на результатах РСК с сапным антигеном.

Аллергическая диагностика. Для аллергической диагностики лимфангита используют гистоплазмин (Королевой) — фильтрат 3...4-месячной культуры криптококка. При сомнительном результате лабораторного исследования применяют дифференциальную диагностику лимфангита и сапа, используя глазную пробу с маллеином и подкожную пробу с гистоплазмином.

Кокцидиоидомикоз (ревматизм пустыни, долинная лихорадка и др.). Хроническое заболевание животных и человека, характеризуется гранулематозным поражением лимфатических узлов, иногда легких у крупного рогатого скота и диссеминированной формой процесса со злокачественным течением у собак.

К заболеванию восприимчивы крупный рогатый скот, лошади, ослы, овцы, свиньи, грызуны (мыши, крысы и др.). Описаны заболевания койотов, лам, кенгуру, обезьян, тигров и других животных. Птицы не болеют. Кокцидиоидомикоз человека относят к группе особо опасных микозов.

Возбудитель кокцидиоидомикоза — дрожжевидный почвенный гриб *Coccidioides immitis*.

Лабораторная диагностика кокцидиоидомикоза основана на результатах микологического и серологического исследований.

Микологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и патогенным свойствам.

Материал для исследования. Объектом исследования служат гной, кровь, содержимое очагов поражения и кусочки пораженных органов.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Из материала готовят препараты «раздавленная капля». При работе с такими препаратами нужно соблюдать предельную осторожность, так как грибы остаются живыми. Можно микроскопировать препараты в 10%-м растворе щелочи при подогревании: в этом случае гриб погибает быстро, но происходит деформация сферул. Чтобы избежать заражения исследователя грибом *C. immitis*, перед микроскопией патологический материал рекомендуют залить 10%-м раствором формалина на 10...15 мин. Такая обработка убивает гриб, но не влияет на его морфологические признаки. Положительным результатом считают обнаружение сферул (например, в гное и мокроте) мицелия (рис. 134, 135). Сферулы — образования правильной круглой формы с двухконтурной оболочкой и с многочисленными эндоспорами. Протоплазма зернистая. Диаметр

39. Культурально-морфологические свойства гриба *C. immitis*

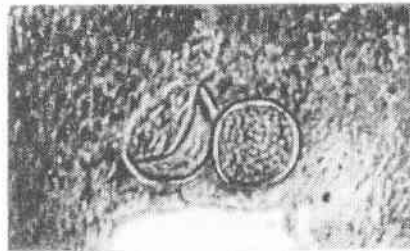


Рис. 134. Паразитарная форма развития *C. immitis*. Сферулы в гное из очага больного животного

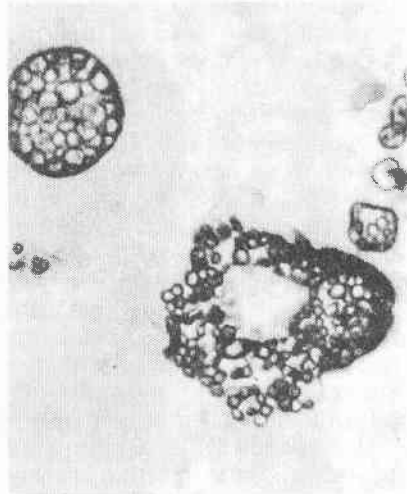


Рис. 135. Вверху слева — неповрежденная сферула *C. immitis* с ясно заметными эндоспорами; в центре — выход мелких эндоспор из разорвавшейся сферулы $\times 1360$ (по Emmons)

сферулы от 20 до 120 мкм. Эндоспоры мелкие. Иногда обнаруживают сферулы с разорванной оболочкой и освобождающимися эндоспорами. Прорастание сферул в мицелий можно наблюдать непосредственно в патологическом материале. Для этого на предметное стекло наносят несколько капель в смеси с физиологическим раствором, покрывают покровным стеклом и для предохранения от высыхания заклеивают парафином по краям. Отсутствие сферул в препаратах при микроскопическом исследовании не дает оснований отрицать кокцидиоидомикоз.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Для посева исследуемый материал предварительно обрабатывают антибиотиками в течение 30...60 мин для подавления бактериального роста. Пенициллин добавляют из расчета 20 ЕД/мл среды, стрептомицин — 40 ЕД/мл. Для получения мицелиальной формы гриба в качестве питательной среды используют агар Литмана, агар Сабуро, сусло-агар; для получения дрожжевидной формы — кровяной агар, печеночный агар с глюкозой, мартеновский бульон (табл. 39). Культивируют при 25...27 и 35...37 °С.

Биопроба. Заражают нативным материалом и солевой суспензией из чистой культуры гриба. К кокцидиоидомикозу восприимчивы мыши, морские свинки, кролики, собаки, куриные эмбрионы. При развитии патологического процесса в зависимости от метода введения исследуемого материала отмечают различные поражения.

| Тип питательной среды | Морфология колоний | Морфология мицелия и спор |
|------------------------------|---|---|
| Жидкие среды | Развивается медленно. На дне пробирки нежный пушистый комочек | Тонкие, слегка ветвистые, редко септированные нити. Позже мицелий разрастается, хорошо выражен, ветвистый, по ходу мицелия крупные хламидоспоры |
| Плотные среды: 25...27 °С | Колонии беловато-мучнистые, складчатые по краям, в центре колоний углубления | Септированный мицелий, микроконидии, хламидоспоры и цепочки прямоугольных артроспор (мицелиальная форма гриба) |
| | 35...37 °С | Колонии редко пушистые, мучнистость отсутствует |
| Агар Литмана | Белые, с возрастом рыжеющие колонии, рыхлый воздушный мицелий. При споруляции на мицелии появляется мучнистый налет | Дрожжевидные споры |

При внутривенном введении культуры гриба развиваются абсцессы во внутренних органах, гибель животных наступает через 20...30 дней.

При интратрахеальном заражении обнаруживают поражение легких и трахеобронхиальных лимфатических узлов.

При внутрибрюшинном заражении через 7...10 дней процесс распространяется по брюшине с поражением внутренних органов.

При подкожном и интрацеребральном методах заражения возникает местный процесс с поражением лимфатических узлов.

При интратестикулярном — развивается гнойный орхит. В гное обнаруживают сферулы различных размеров и на разных этапах созревания, реже мицелий.

Двух-трехдневные куриные эмбрионы погибают через 3...6 дней после заражения. И использованные в работе материалы и инструменты подлежат немедленной стерилизации в автоклаве.

Серологическая диагностика основана на результатах следующих реакций: РА с антигеном из убитой культуры, РСК с кокцидиоидином, РП с полисахаридным антигеном.

При работе с *C. immitis* необходимо соблюдать правила техники безопасности, в частности надевать марлевые маски. Посевы проводить лучше в пробирки со средой Литмана, мясо-пептонный бульон или другие жидкие среды, так как их удобнее использовать для микроскопических работ и заражения животных. На этих средах гриб образует более компактные, непылящие колонии. Пересев с твердых сред рекомендуют делать до начала спороношения.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить и промикроскопировать препараты из материала от животных, больных дерматомикозом.
2. Изучить культуральные свойства возбудителей трихофитии и микроспории.
3. Изучить культурально-морфологические характеристики грибов родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida*.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают дерматомикозы?
2. Какова схема лабораторного исследования на дерматомикозы?
3. По каким критериям дифференцируют грибы родов *Microsporium* и *Trichophyton*?
4. Какие плесневые и дрожжеподобные грибы вызывают микозы?
5. Какие вакцины применяют против дерматомикозов сельскохозяйственных животных?

Тема 38

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОТОКСИКОЗОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ГРИБАМИ РОДОВ *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM*, *FUSARIUM*, *STACHYBOTRYS*, *DENDRODOCHIUM*

Цель занятий. Ознакомить студентов с характеристикой микотоксинов, вызывающих микотоксикозы, грибами-продуцентами этих токсинов и методами исследований для постановки диагноза на микотоксикозы.

Оборудование и материалы. Культуры грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybothrys* и др. на агаре Чапека или других средах в чашках Петри (в больших пробирках), препаративные иглы или микологические крючки, предметные и покровные стекла, микроскопы, таблицы и плакаты по данной теме.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Микотоксикозы. Болезни животных и человека; характеризуются отравлением, которое возникает при поедании кормов (пищи), содержащих токсические продукты жизнедеятельности микроскопических грибов-плесеней — микотоксины (от греч. *mykes* — гриб и *toxinum* — яд). Известно около 250 видов различных микроскопических грибов, продуцирующих 100 токсических метаболитов. Природными субстратами грибов-продуцентов микотоксинов служат разнообразные сельскохозяйственные культуры. К микотоксинам чувствительны почти все виды

домашних, диких животных, птицы и рыбы. Наименование микотоксикоза происходит от названия токсина или гриба-продуцента. При диагностике микотоксикоза наибольшее внимание уделяют обнаружению токсина, поскольку гриб-продуцент в ряде случаев к моменту исследования погибает и, кроме того, один и тот же микотоксин могут синтезировать различные виды грибов.

Лабораторная диагностика микотоксикозов основана на результатах токсико-биологических, органолептических, микологических и физико-химических исследований.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы всех кормов, входивших в суточный рацион животного в течение одного месяца до проявления болезни, а также остатки кормов из кормушек, содержащее желудочно-кишечного тракта павших животных и др. Отбор средних проб корма проводят ветеринарные и зооинженерные специалисты с представителями предприятий. Отобранную среднюю пробу делят на две части, упаковывают в чистые сухие стеклянные банки объемом 2...3 л, герметически закрывают и пломбируют. Одну часть отправляют в лабораторию, другую хранят в хозяйстве в течение одного месяца в условиях, предотвращающих порчу или вторичное загрязнение. В документе указывают цель исследования, вид кормового средства, назначение, массу всей партии, место отбора пробы, основные клинические признаки у больных животных. Прилагают копию акта вскрытия трупов (при гибели животных), копию экспертиз ветеринарной лаборатории об исключении инфекционных болезней и отравлений животных химическими или растительными ядами (если такие исследования были проделаны лабораторией).

Органолептическое исследование. Определяют внешний вид, цвет, запах корма, выявляют признаки, отличающие дефектный корм от доброкачественного (изменение цвета; затхлый, плесневелый или гнилостный запах; наличие на поверхности корма мицелия гриба и др.). О санитарном качестве зерна можно косвенно судить по цвету и состоянию зерновых оболочек.

Токсикологическое исследование. Проводят на различных биологических моделях: кроликах, аквариумных рыбках гуппи породы Винер, белых мышках или сельскохозяйственных животных.

На кроликах ставят кожную пробу. К 50 г измельченного корма добавляют 150 мл диэтилового эфира (эфир для наркоза) или ацетона. Смесь встряхивают при комнатной температуре с помощью шутгель-аппарата 3 ч. Экстракт фильтруют и выпаривают до полного исчезновения запаха. Налет, оставшийся на стенках чашки, смывают небольшим количеством эфира и используют для биопробы, которую ставят на кроликах массой 2...2,5 кг. Предварительно у кролика в области бедра, лопатки или бока выстригают участок кожи 6 см². Пигментированная или с признаками шелушения кожа непригодна для исследования.

На одном кролике можно ставить не более четырех проб. На выстриженный участок кожи кролика наносят стеклянной лопаткой половину экстракта и легко втирают его. При восковидной консистенции экстракта его предварительно подогревают. Часть участка оставляют свободной от экстракта как контрольную. Через 24 ч наносят оставшийся экстракт. Чтобы предупредить его слизывание, кролику надевают воротник (не менее чем на три дня). Учет проводят на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают вести наблюдение в течение 3...5 дней в зависимости от реакции, после чего дают окончательную оценку: а) корм нетоксичный — отсутствуют воспалительная реакция и изменения на коже; б) корм слаботоксичный — шелушение кожи, отечность, болезненность, незначительное утолщение кожи с образованием отдельных корочек; в) корм токсичный — резкая гиперемия, отек, утолщение кожи, болезненность, появление язвы и струпа.

В качестве дополнительного теста определяют токсичность кормов на аквариумных рыбках. Методика основана на извлечении микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов, экстракции хлороформом и исследовании на рыбках гуппи. В раствор экстракта помещают 5 рыбок независимо от пола и возраста. Ведут наблюдение в течение 24...30 ч. Оценка степени токсичности корма: а) нетоксичный — при гибели не более одной рыбки в течение 24 ч; б) слаботоксичный — при гибели 2...4 рыбок; в) токсичный — при гибели всех 5 гуппи за тот же отрезок времени.

Методика определения токсичности корма на белых мышках основана на извлечении токсических веществ из жмыхов, кормовых дрожжей ацетоном и введении концентрированного экстракта однократно в желудок мышам массой 20...25 г. Животных наблюдают в течение 3 сут, не ограничивая их в корме и питье. Оценка результатов корма: а) нетоксичный — мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений нет; б) слаботоксичный — мыши живы, при вскрытии у убитых обнаруживают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое; в) токсичный — гибнут все мыши (или одна), на вскрытии павших или убитых устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто дегенерацию тканей печени, почек или кровоизлияние в паренхиматозных органах. Если токсичность корма не выявлена всеми перечисленными методами, подозрительные корма скармливают лабораторным животным (цыплятам, утятам, голубям, белым мышам, морским свинкам, кроликам) или животным тех видов, которые болели в хозяйстве.

Микологический анализ. Включает в себя выделение из кормов и идентификацию грибов-продуцентов микотоксинов. С этой целью из кормов делают посева в чашки Петри с агаром Чапека,

сусло-агаром или в жидкую среду Билай. Грубые корма высевают во влажные камеры со средой Ван—Итерсона. Перед посевом агар расплавляют в водяной бане, после охлаждения до 45...50 °С в него для подавления роста сопутствующей микрофлоры добавляют антибиотики (пенициллина $5 \cdot 10^4$ ЕД/л и стрептомицина 10^5 ЕД/л среды). Для приготовления влажной камеры со средой Ван—Итерсона на дно чашки Петри кладут слой ваты с кружком фильтровальной бумаги по диаметру чашки и стерилизуют в сушильном шкафу. Перед посевом на фильтровальную бумагу наливают среду Ван—Итерсона до увлажнения бумаги, не создавая избытка влаги (около 5 мл).

Для выделения грибов из зерен последние раскладывают по поверхности фильтровальной бумаги по 10 штук, чтобы они не прикасались одно с другим. Посевы культивируют при 22...25 °С 3...10 дней до образования характерного спороношения, после чего проводят макро- и микроскопическое исследование культур грибов с целью идентификации.

При макроскопическом исследовании учитывают различные признаки выросших колоний: цвет, форму, консистенцию, характер роста, образование склероциев, выделение пигмента, степень развития воздушного мицелия. Затем готовят препараты «раздавленная капля». Микологическим крючком или препаровальной иглой берут частицы мицелия (желательно со спороношением из молодых культур с периферии, от старых — из центра колоний) и вносят их в фиксирующую жидкость. Другой иглой материал расправляют на предметном стекле и покрывают покровным стеклом, слегка прижимая его. Микроскопируют с помощью малого объектива ($\times 8$, $\times 40$) или в иммерсионной системе при слегка спущенном конденсоре. Токсичность культур определяют методом кожной пробы на кроликах или другим способом.

Физико-химический анализ. Его цель — качественное и количественное определение микотоксинов в кормах и других материалах с помощью различных методов — люминесцентного анализа, хроматографии и т. д..

При оценке результатов анализов необходимо учитывать данные всех исследований, а в случае постановки диагноза — клинические признаки и характер патологоанатомических изменений.

Афлатоксикозы. Заболевания, возникающие при поедании животными кормов, содержащих афлатоксины. Все афлатоксины (B_1 , B_2 , C_1 , C_2 и их производные M_1 , M_2 и др.) отнесены к фурокумаринам. Афлатоксин M_1 — продукт метаболизма афлатоксина B_1 , выделяющийся с молоком. В естественных условиях афлатоксины встречаются в растительных продуктах, кроме того, некоторые токсигенные штаммы грибов (*Aspergillus flavus* и *A. parasiticus* и др.) вырабатывают их при определенной температуре и влажности.

Природные субстраты грибов-продуцентов: арахис, кукуруза и

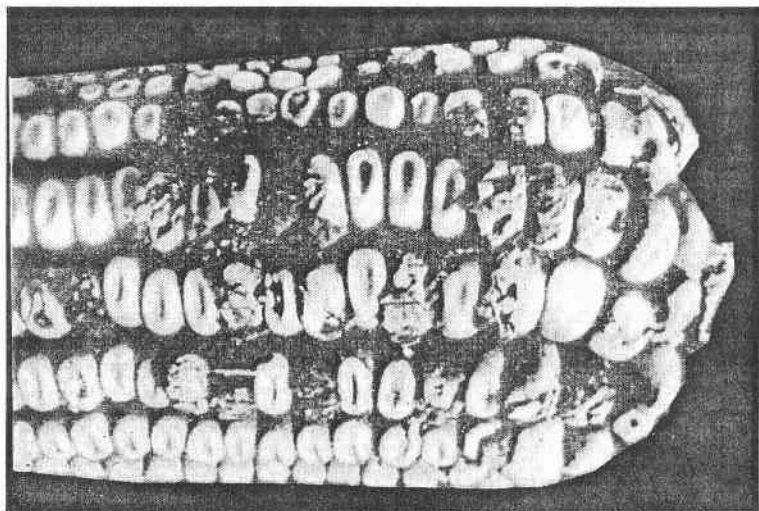


Рис. 136. Рост гриба *A. flavus* на початке кукурузы (пораженные участки черного цвета)

другие различные зерновые и бобовые культуры, семена хлопчатника и др. (рис. 136). Афлатоксины оказывают гепатотоксическое и гепатоканцерогенное, мутагенное, тератогенное и иммунодепрессивное действие (рис. 137). Наиболее чувствительны к афлатоксинам поросята в возрасте до 3 мес, супоросные свиноматки, телята, откормочные свиньи, взрослый крупный рогатый скот и овцы, лошади, птицы (утки, индейки, гуси, фазаны, куры). Де-



Рис. 137. Парез конечностей у четырехмесячного подсвинка в первые сутки после дачи зерна, пораженного токсичным штаммом *A. fumigatus*

фицит в кормах витаминов, белка или нарушение у животных обмена веществ повышают чувствительность животных к афлатоксинам.

Лабораторная диагностика афлатоксикозов включает в себя выделение афлатоксина и определение его количества методом тонкослойной хроматографии согласно действующей инструкции. Подтверждением служит обнаружение афлатоксина в органах и тканях животного. Если в пробах не выделены афлатоксины, диагноз ставят по результатам выделения гриба-продуцента из фекалий или содержимого желудочно-кишечного тракта, остатков корма или пыли, взятых из силоса или бункера, где хранился корм, и воспроизведения в эксперименте культурой этого гриба заболевания (биопроба), аналогичного по всем признакам, которые наблюдали в хозяйстве.

Материал для исследования. В лабораторию отправляют корма, молоко, фекалии; от павших животных — печень, почки, мышечную ткань.

Выделение и идентификация грибов рода *Aspergillus*, а также культуральные и морфологические свойства описаны в теме 37.

Охратоксикозы. Заболевания, возникающие при поедании животными кормов, содержащих охратоксины — производные гидроизокумарина. Из известных охратоксинов — А, В, С и D — наиболее токсичен охратоксин А, который относят к группе кислых микотоксинов, экстрагирующихся из корма при кислом рН.

Типичные продуценты охратоксинов: грибы *Aspergillus ochraceus*, от которых произошло название микотоксина (именно из них токсин был впервые выделен), и *Penicillium viridicatum*. Охратоксины могут продуцировать и другие грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Токсигенные штаммы *A. ochraceus* в большинстве своем, кроме охратоксинов, образуют пенициллиновую кислоту, а штаммы *P. viridicatum* — цитрины. Поэтому на практике корма могут быть заражены сразу несколькими токсинами. Однако основным токсическим агентом в этих случаях является охратоксин А.

Природные субстраты *A. ochraceus* и *P. viridicatum*: ячмень, кукуруза, овес, пшеница, горох, рис, гречиха, соевые бобы, арахис, фасоль, земляные орехи, кофе и др.

Охратоксины оказывают на организм животных нефротоксическое, тератогенное и канцерогенное действие. Охратоксикозам подвержены свиньи, птицы, крупный рогатый скот, лошади. Очень чувствительны к охратоксинам собаки.

Лабораторная диагностика охратоксикозов направлена на обнаружение токсина или грибов-продуцентов и основана на результатах токсико-микологического и физико-химического анализа кормов и патологического материала. Методы определения микотоксина и идентификации грибов-продуцентов описаны в

данной теме. Выделение и идентификация грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium* описаны в теме 37.

Пенициллотоксикозы. Заболевания, возникающие при поедании животными кормов, зараженных микотоксином — пеницилловой кислотой. Последнюю длительное время применяли как антибиотик, но из-за высокой токсичности в лечебной практике больше не используют.

Продуценты пеницилловой кислоты: различные виды грибов, преимущественно рода *Penicillium* — *P. ruberulum*, *P. cyclopium*, *P. viridicatum* и др. и некоторые варианты грибов родов *Aspergillus*, *A. ochraceus*, *A. sulphureus*.

Природные субстраты этих грибов: кукуруза, бобовые корма, табак.

По сравнению с фузарио- и аспергиллотоксикозами пенициллотоксикозы изучены недостаточно. Наиболее чувствительны к пеницилловой кислоте свиньи. Под влиянием этого токсина у животных происходит расширение кровеносных сосудов, глубокие дистрофические изменения в проксимальных канальцах почек. Пеницилловая кислота оказывает цитотоксическое, кардиотоксическое и канцерогенное действие на организм животных. В развитии смешанного микотоксикоза свиней, кроме различных токсинов, продуцируемых грибами рода *Penicillium*, принимает участие пеницилловая кислота.

Лабораторная диагностика пенициллотоксикозов основана на результатах токсико-микологического анализа, проводимого для обнаружения токсина или гриба-продуцента.

Рубратоксикозы. Группа болезней, развивающихся при скармливании животным кормов, загрязненных рубратоксинами А, В, С. Наиболее распространен рубратоксин В.

Грибы-продуценты рубратоксина — *Penicillium rubrum* и *P. purpurogenes*. Последний вырабатывает в больших количествах рубратоксин В. Указанные грибы нередко выделяют из кормов вместе с токсигенными *A. flavus*, что говорит о возможности их синергического действия при совместном развитии на кормах.

Природные субстраты *P. rubrum* и *P. purpurogenes*: различные зерновые, бобовые, арахис, корма, семена подсолнечника и др.

Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны к рубратоксину свиньи, особенно поросята. Наиболее остро и с высоким летальным исходом болезнь протекает у новорожденных поросят (токсин выделяется с молоком). Рубратоксины А и В оказывают гепатотоксическое, мутагенное и тератогенное действие на животных.

Лабораторная диагностика рубратоксикозов включает в себя выделение и идентификацию грибов рода *Penicillium* (см. тему 37).

Для воспроизведения заболевания в эксперименте ставят биопробу на двух свиноматках с новорожденными поросятами из

благополучного по инфекционным болезням хозяйства. Свиноматкам скармливают корм, загрязненный выделенной культурой гриба.

При положительном результате биопробы у свиноматок появляются признаки отравления: диарея, угнетение, частичный отказ от корма. Поросята после первого сосания свиноматки заболевают и погибают на 4...5-й день. Клинические признаки, патологоанатомические изменения у подопытных животных аналогичны наблюдаемым в хозяйствах.

Фузариотоксикозы. Заболевания, развивающиеся при скармливании животным кормов, загрязненных микотоксинами, продуцируемыми грибами только рода *Fusarium*, могут быть вызваны отдельными микотоксинами или их комбинацией. Фузариотоксикозы различают по видам микотоксинов.

Ф-2 токсикоз (микотоксический токсикоз, вульвовагинит неполовозрелых свинок). Болезнь вызывает зеараленон (токсин Ф-2, ферментативно-эстрогенное вещество (ФЭВ) и его производные: α - и β -зеараленоны. Микотоксин оказывает на организм животного эстрогенное (вызывающее охоту) и тератогенное воздействие.

Продуценты микотоксина зеараленона — грибы *F. graminearum*, *F. moniliforme* и др. — типичные почвенные микроорганизмы, способные развиваться на влажном корме при его хранении. Грибы хорошо растут на зерне пшеницы, кукурузы, сорго, хуже на зерне ячменя и овса, в сене. К зеараленонтоксикозам восприимчивы свиньи, крупный рогатый скот (болезнь характеризуется массовыми вульвовагинитами, отечностью молочной железы, у хряков отеком препуция). Наиболее чувствительны свиньи и хряки в возрасте 2...5 мес. α -Зеараленон в 3...4 раза, а β -зеараленон в 1,2 раза активнее по эстрогенному действию, чем зеараленон. В основном они влияют на матку, яичники, тестикулы и молочные железы. Из организма ассимилированный зеараленон и его токсические метаболиты выделяются с желчью, фекалиями и мочой, а у лактирующих животных и с молоком. На птиц зеараленон действует слабее.

Лабораторная диагностика Ф-2 токсикоза (зеараленонтоксикоза) основана на обнаружении токсических доз микотоксина в корме и его токсических метаболитов α и β в органах и тканях животных; при подостром течении болезни — в фекалиях. Микотоксикологическое исследование (кукурузы, кормов) проводят с целью обнаружения гриба-продуцента.

При микотоксикологическом исследовании необходимо исключить отравления, вызванные люцерной, клевером и другими бобовыми, содержащими эстрогенные вещества. При органолептическом исследовании выявляют пораженные грибами зерновые корма — легкоовесные зерна с матово-серой оболочкой; иногда на оболочке заметны пятна или коростинки красного и розо-

во-оранжевого цвета, представляющие собой грибицы или спороношение гриба. Такую окраску можно обнаружить и в самом зерне при его надломе.

Материал для исследования. В лабораторию отправляют корм, пораженные органы и ткани животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Соскобы с пораженных зерен, отобранных при органолептическом исследовании, помещают на предметное стекло в каплю 50%-го водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. В поле зрения обнаруживают характерный для грибов рода *Fusarium* септированный мицелий, макроконидии из нескольких крупных удлинённых клеток веретенообразной или серповидной формы или микроконидии (более мелкие), чаще одноклеточные на простых или разветвленных конидиеносцах. Иногда находят хламидоспоры, склероции.

Выделение и идентификация грибов рода *Fusarium*. Грибы хорошо растут на агаре Чапека, сусло-агаре и среде Билай с pH 4,5...5,6 при температуре 18...24 °C.

На твердых питательных средах *F. graminearum* образует колонии с хлопьевидным пушистым белым, бело-розовым или кроваво-красным мицелием.

При изучении морфологии выросшей культуры грибов обнаруживают на воздушном мицелии спородохии (сплетения конидиеносцев в виде подушечек на поверхности гифов), состоящие из макроконидий различной формы (веретеновидные, серповидные, эллиптически изогнутые, конические). Встречаются розовые или темно-красные склероции. Иногда обнаруживают промежуточные хламидоспоры.

С помощью токсикобиологического анализа выявляют дермо-некротическое действие микотоксинов, находящихся в корме. Ф-2 токсин не оказывает дермо-некротическое действие, не вызывает летального исхода. Методы микотоксикобиологических исследований описаны ранее.

Т-2 токсикоз. Заболевание животных, возникающее при поедании корма, загрязненного трихотеценовым микотоксином Т-2. Это наиболее изученный из типичных фузариотоксинов, продуцент которого — гриб *Fusarium sporotrichioides* (син. *F. tricinctum*).

Биологическое действие токсина Т-2 многостороннее: он поражает сердечно-сосудистую и нервную системы, угнетает развитие лимфоидных органов у растущих животных, снижает количество лейкоцитов в крови, ухудшает процесс выработки антител после активной иммунизации на ранней стадии развития иммунной реакции у животных, нарушает функции Т- и В-лимфоцитов, ингибирует биосинтез белка. Токсин Т-2 более опасен, чем другие известные микотоксины, продуцируемые грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Наиболее чувствительны к данному микотоксину крупный рогатый скот, свиньи, птицы, которым скарм-

ливают токсический корм (зерно). Чувствителен к отравлению и человек при поедании так называемого «пьяного хлеба», выпеченного из зерна, пораженного токсигенным грибом.

Природные субстраты гриба *F. sporotrichioides*: кукуруза, силос, сено, пшеница и др.

Для постановки диагноза достаточно обнаружить определенное количество токсина в кормах согласно методике качественного определения микотоксина Т-2 в зернофураже. Для микотоксикологического исследования корма необходимо предварительно исключить инфекционную природу болезни (отечную болезнь у свиней и др.), а также отравления ядовитыми растениями, минеральными и органическими ядами.

Токсикологическое исследование корма. Обязательно проводят биопробой на коже кролика. Методика описана выше. Токсин Т-2 оказывает резко выраженное дермонекротическое действие (рис. 138).

Выделение и идентификация гриба *F. sporotrichioides*. Посевы культивируют из исследуемого материала, как при микотоксикозе Ф-2, после чего изучают культуральные и морфологические признаки выросших культур.

F. sporotrichioides образуют колонии с хорошо развитым воздушным мицелием белого, розового или желтоватого цвета (рис. 139).

В препаратах из колоний обнаруживают микроконидии, чаще одноклеточные, реже с одной или тремя перегородками, грушевидной или лимоновидной, шаровидно-яйцевидной или веретено-шаровидной формы (рис. 140). Встречаются также макроконидии веретено-серповидной формы (рис. 141). Может быть обильное количество хламидоспор.

Стахиботриотоксикоз. Остро или подостро протекающий микотоксикоз, возникающий при поедании животными кормов и подстилки, загрязненных грибами *Stachybotrys alternans* (син. *S. atra*) или ток-



Рис. 138. Некроз кожи у кролика с образованием толстого струпа на месте нанесения эфирной вытяжки из культуры *F. sporotrichioides*, выращенной на овсе

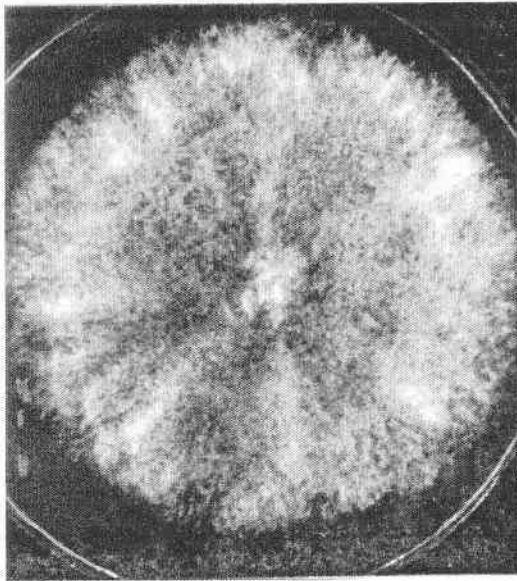


Рис. 139. Колония *F. sporotrichioides* на картофельном агаре. Рост при 22...24 °С. Возраст 4 сут

сическими метаболитами этого гриба. Болезнь проявляется в виде поражений кожи, общего токсикоза, абортов, нарушений иммунной и нервной систем, изменений в кровеносных органах, тяжелых расстройств желудочно-кишечного тракта. Отмечают слабое прикрепление волос, иногда многочисленные кровоизлияния на бесшерстных местах. Частные признаки болезни: конъюнктивит, гиперемия слизистой оболочки ротовой полости и носа, сливация и серозные, позднее серозно-геморрагические

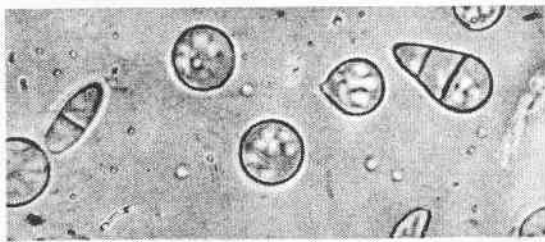


Рис. 140. Шаровидные, удлиненные и шаровидно-грушевидные микроконидии *F. sporotrichioides* без перегородок и с одной-двумя перегородками. Культура на картофельном агаре. Рост при 22...24 °С. Возраст 7 сут

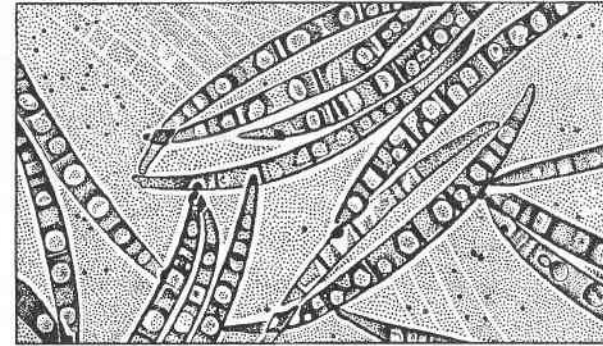


Рис. 141. Макроконидии *F. sporotrichioides* — серповидно-веретеновидные, эллиптически изогнутые, постепенно суженные к обоим концам. Культура на картофельном агаре. Рост при 22...24 °С. Возраст 7 сут

выделения из носа, некротические очаги на слизистой оболочке ротовой полости. Чаще обнаруживают некротические язвы на деснах, вокруг зубов и на языке (рис. 142).

К стахиботриотоксикозу чувствительны лошади, крупный рогатый скот, овцы, птицы, свиньи.

Возбудитель стахиботриотоксикоза относят к высшим несовершенным грибам (класс *Deuteromycetes*) рода *Stachybotrys* (активные разрушители целлюлозы). *Stachybotrys alternans* образует

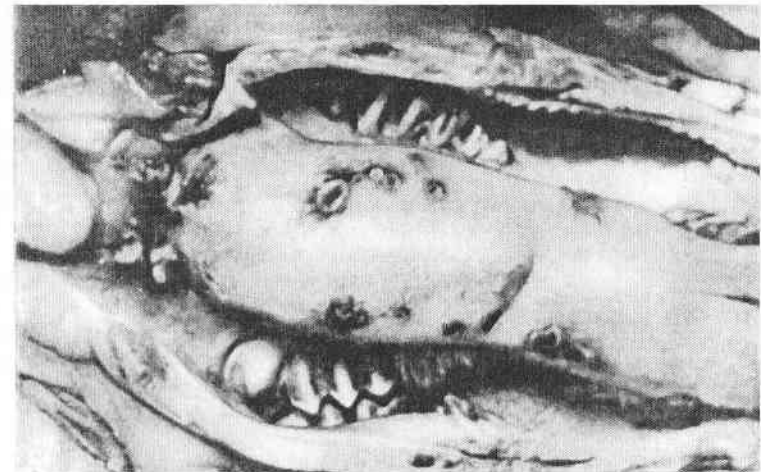


Рис. 142. Язвы на слизистой оболочке языка при стахиботриотоксикозе крупного рогатого скота

сатратоксины А, D, F и другие, которые относят к группе трихотеценов. Трихотецены (известно около 60 токсинов) оказывают на животных нейротоксическое, геморрагическое, лейкопеническое, иммунодепрессивное, дермотоксическое, тератогенное действие. Токсин гриба *Stachybotrys alternans* образуется постепенно в стеригмах, конидиях и конидиеносцах и накапливается в субстрате. Токсин устойчив к нагреванию, даже автоклавированию, но инактивируется под действием щелочей и хлора. С прекращением роста гриба заканчиваются образование и накопление микотоксина (10...25 дней).

Природные субстраты гриба: солома (ячменная, ржаная, пшеничная, овсяная), сено (чаще злаковое), зерно (ячмень, овес), кукуруза, рис, горох, хлопок.

Лабораторная диагностика стахиботриотоксикоза основана на органолептическом, токсико-биологическом и микологическом исследовании корма.

Органолептическое исследование. При осмотре кормов обращают внимание на наличие темного или черного налета на стеблях соломы (сена). В дифференциальном диагнозе исключают сап.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Обращают внимание на наличие вегетативных и репродуктивных структур, характерных для гриба. Соломинки, пораженные грибом *S. alternans*, отбирают с помощью лупы по черному порошистому налету, особенно в узлах соломинок. Налет соскабливают, помещают на предметное стекло в каплю 50%-го водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. В поле зрения обнаруживают темноокрашенные конидиеносцы и опавшие споры гриба (рис. 143).

Токсико-биологическое исследование. С целью определения токсина гриба *S. alternans* используют куриные эмбрионы. После инокуляции токсина в желточный мешок 6...10-дневные эмбрионы погибают в течение 18 ч.

Выделение и идентификация гриба *S. alternans*. Аэроб, температурный оптимум 24...26 °С, рН 6,8...7,0, влажность 45...50 %. При влажности 20 % не растет. Гриб хорошо развивается на естественных субстратах и на искусственных питательных средах: Ван—Итерсона, на агаре Чапека или сусло-агаре. В чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной средой Ван—Итерсона, *S. alternans* образует колонии от темно-серого до черного цвета (рис. 144).

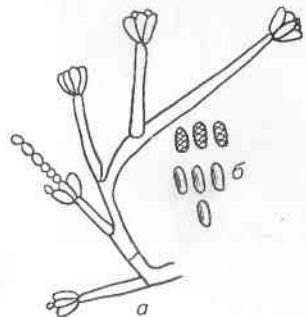


Рис. 143. Конидиеносец (а) и конидии (б) *Stachybotrys alternans*

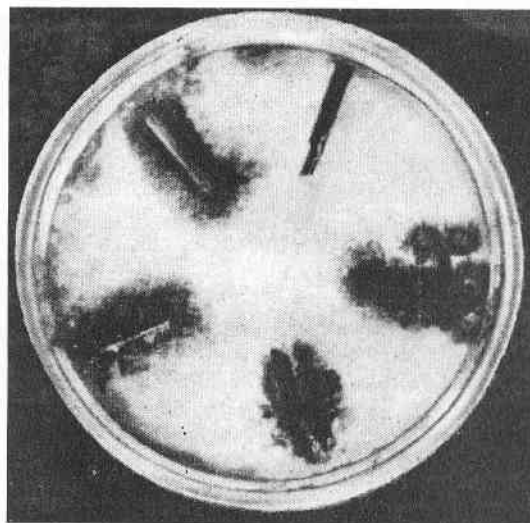


Рис. 144. Рост гриба *Stachybotrys alternans* на соломе во влажной камере

На агаре Чапека гриб образует колонии с двумя зонами (рис. 145). Центральная зона складчатая, черного цвета, по периферии отмечают белую прозрачную каемку. Цвет питательной среды вокруг колоний бурый, нередко с темно-вишневым оттенком. На сусло-агаре *S. alternans* образует черные колонии с бороздками, радиально расходящимися от центра.

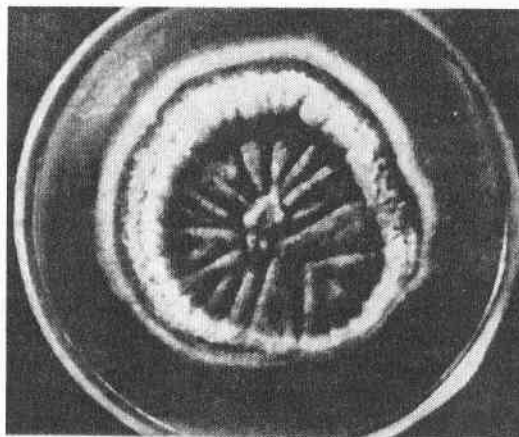


Рис. 145. *Stachybotrys alternans* на агаре Чапека

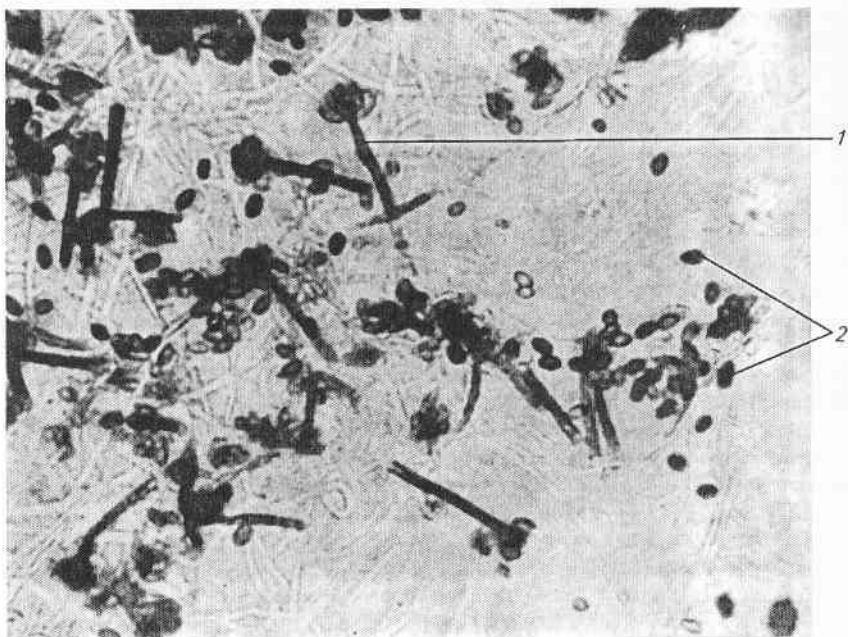


Рис. 146. Конидиеносцы (1) и конидии (2) *Stachybotrys alternans* на агаре Чапека

Цвет мицелия в молодой культуре бледно-оливковый, с возрастом становится оливково-бурым. Конидиеносцы также изменяются в зависимости от возраста и могут быть простыми и разветвленными, с редкими перегородками. На верхушке конидиеносца можно наблюдать сросшиеся у основания яйцевидные стеригмы, называемые мутовками. На вершине стеригм образуются одноклеточные округлые конидии. В молодой культуре они гладкие, бледно-оливкового цвета. Зрелые конидии отличаются шиповидно-бордавчатой формой, непрозрачностью и черным цветом. Каждая стеригма образует по 3...7 конидий. Они склеиваются слизью и формируют головку на пучке стеригм (рис. 146).

Дендродохиотоксикоз. Тяжелопотекающий микотоксикоз, часто с молниеносной гибелью. Характеризуется расстройством центральной нервной, сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, кровоизлияниями во внутренних органах, язвенно-некротическими процессами на пяточке (у свиней), коже губ и слизистой оболочке ротовой полости, дегенеративными изменениями в паренхиматозных органах. В отличие от стахиботриотоксикоза при дендродохиотоксикозе отсутствуют кровоизлияния в паренхиматозных органах и изъязвления желудка.

Возбудитель — гриб *Dendrodochium toxicum* (рис. 147). Из гриба выделен микотоксин дендродохитоксин (дендродохин), который относят к трихотеценам. Из всех известных трихотеценовых микотоксинов дендродохин наиболее токсичен. Токсин образуется при 25 °С в субстрате, на котором растет гриб, в его мицелии и конидиях. Однократная доза 350...450 г пораженной соломы вызывает гибель лошадей в течение нескольких часов после приема корма. Дендродохин устойчив к высокой температуре, выдерживает нагревание в течение 1 ч при 125 °С.

Лабораторная диагностика дендродохиотоксикоза основана на результатах главным образом токсико-микологического анализа кормов, из которых выделяют гриб *D. toxicum*.

Материал для исследования. Грубые корма, в основном солома, мякина, сырой хлопок и другие растительные остатки, а также овес, суданская трава, конопля, горох, которые служат природными субстратами для гриба *D. toxicum*.

Органолептическое исследование. Проводят в целях профилактики болезни за месяц до скармливания кормов животным.



Рис. 147. Конидиеносец (а) и конидии (б) у *D. toxicum*

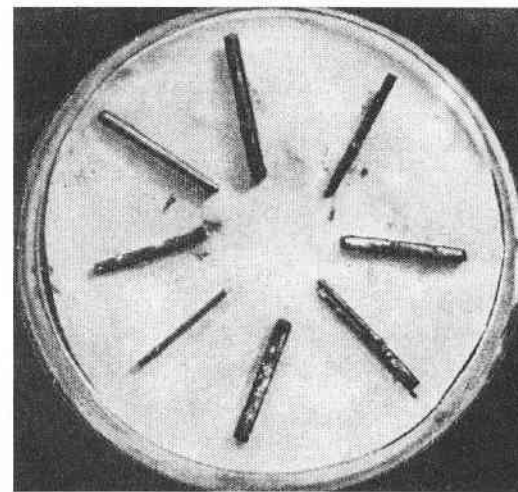


Рис. 148. Рост гриба *Dendrodochium toxicum* на соломе во влажной камере

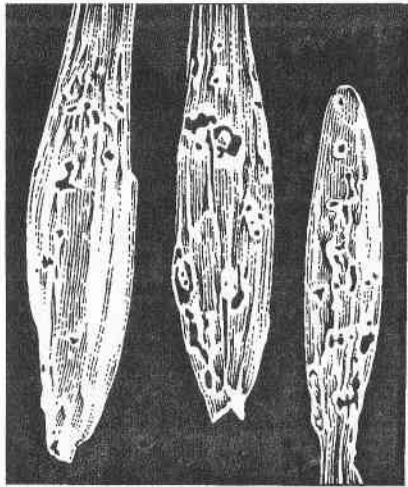


Рис. 149. Зерна овса, зараженного грибом *D. toxicum* (на зерновой оболочке темные спородохии гриба окружены белой каймой мицелия)

На соломе чаще обнаруживают мицелий гриба и очень редко конидию. Часто у корма нормальный внешний вид, так как гриб разрастается в основном внутри субстрата.

Микроскопическое исследование. Проводят после посева исследуемого материала на растительные субстраты и питательные среды (рис. 148).

Токсико-биологическое исследование. Заключается в из-

влечении из корма токсических веществ и определении их дермонекротического действия на кроликах. В качестве дополнительных исследований используют метод определения токсичности кормов на аквариумных рыбках и белых мышках, морских свинок и крысах. Методики описаны выше.

Выделение и идентификация гриба *D. toxicum*. Аэроб, хорошо растет на естественных средах: сене, ячмене и на обычных лабо-

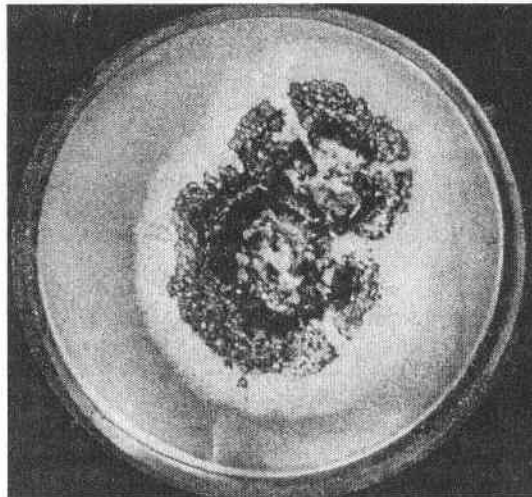


Рис. 150. Колония *D. toxicum* на агаре Чапека

раторных средах: агаре Сабуро, сусло-агаре, среде Чапека и др. Температурный оптимум 20...25 °С (диапазон 7...35 °С). При более низкой температуре гриб образует только мицелий. Оптимальная кислотность питательных сред для роста и развития гриба рН 6,0...7,0. На растительных субстратах на 3...4-й день после посева появляются небольшие рыхлые мицелиальные подушечки, а затем на 10...12-й день — спородохии (рис. 149). Спородохии — тесный слой коротких, часто разветвленных конидиеносцев на поверхности выпуклого сплетения гиф и стромы в виде подушечек. Мицелий бесцветный, гифы септированные.

На агаре Сабуро обнаруживают шаровидные, реже грушевидные, интеркалярные и терминальные хламидоспоры. На жидких средах гриб растет на поверхности субстрата в виде пленчатого, вначале пушистого мицелия. На 5...7-й день развиваются спородохии. На агаре Чапека (рис. 150) при комнатной температуре гриб образует пушистый воздушный мицелий белого цвета, спородохии развиваются медленно. При температуре 22...25 °С образуется белый стелющийся мицелий, колонии круглые, спородохии появляются на 4...5-й день. Спородохии — поверхностные, округлые или неправильной формы, 1,2 мм в диаметре. По периферии окаймлены белым плоским мицелиальным ободком, в центре — оливково-черный слой конидий. С возрастом отдельные спородохии сливаются и образуют сплошной оливково-черный слой.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить культурально-морфологические свойства грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*.
2. Провести органолептический анализ пораженных плесневыми грибами кормов (комбикорма, сено).
3. Ознакомиться с результатами дермонекротической пробы на кролике.
4. Составить схему лабораторного исследования на микотоксикозы.

Контрольные вопросы

1. В чем основные отличия микозов от микотоксикозов?
2. Каковы морфологические и культуральные свойства возбудителей микотоксикозов?
3. Какой материал отправляют в лабораторию и в чем состоит его исследование на выявление микотоксинов?
4. Как ставят биопробу при диагностике микозов и микотоксикозов?
5. На каких питательных средах культивируют возбудители микозов и микотоксикозов?

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ, ВОЗДУХА И ПОЧВЫ

Цель занятия. Ознакомить студентов с основными методами и показателями, необходимыми для санитарно-микробиологической оценки объектов внешней среды.

Оборудование и материалы. Прибор для подсчета колоний, колбы с пробами воды, бактериологические пробирки с 9 мл воды, пробирки с 10 мл расплавленного агара, мерные стерильные пипетки на 2 мл, стерильные чашки Петри, чашки Петри с МПА, чашки Петри с кровяным МПА, навески почвы, стерильная водопроводная вода в колбе — 270 мл, пробирки со средой Кесслера, Вильсона—Блера.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов окружающей среды проводят санитарно-бактериологические исследования, цель которых состоит в определении эпизоотологической и эпидемиологической безопасности. Показателем неблагополучия служит выявление патогенных микроорганизмов. Однако прямое их обнаружение связано с большими трудностями, и прежде всего с низкой концентрацией данных микробов, которые в основном не могут размножаться в воде, воздухе и почве. Поэтому в санитарно-микробиологической практике используют косвенные методы, направленные на определение микробной обсемененности объекта и обнаружение в нем так называемых санитарно-показательных бактерий. О бактериальной обсемененности судят по м и к р о б н о м у ч и с л у — общему количеству микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).

Содержание санитарно-показательных бактерий определяют по двум показателям: титру и индексу. Т и т р о м называют минимальный объем или массу, в которых выявляют данные бактерии, и н д е к с о м — количество санитарно-показательных бактерий, содержащихся в соответствующем количестве среды.

К санитарно-показательным бактериям относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, для которых среда обитания — кишечник или воздушно-дыхательные пути. Они характеризуются следующими свойствами: 1) постоянно выделяются с калом или каплями слизи из воздушно-дыхательных путей; 2) не имеют других мест обитания; 3) способны сохраняться в окружающей среде то же время, что и патогенные бактерии, паразитирующие

в кишечнике или воздушно-дыхательных путях; 4) не способны интенсивно размножаться вне организма хозяина и изменять свой свойства.

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

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

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

Присутствие *C. perfringens*, *C. sporogenes* и других клостридий в почве свидетельствует о ее фекальном загрязнении, причем как свежем, так и давнем, поскольку эти бактерии образуют споры, что позволяет им длительно переживать в окружающей среде (в частности, в почве).

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

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

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

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

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

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

открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, сточные жидкости.

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

Определение микробного числа воды. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, воду открытых водоемов — по 1,0; 0,1; 0,01 мл. Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10...12 мл расплавленного и охлажденного до 40...45 °С питательного агара, который тщательно перемешивают с водой. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 1...2 сут. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37 °С в течение суток, другую — 2 сут при 20 °С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине колоний и вычисляют **м и к р о б н о е ч и с л о в о д ы** — количество микроорганизмов в 1 мл.

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

✓ **Титрационный метод.** В глюкозо-пептонную среду (1%-я пептонная вода, 0,5%-й раствор хлорида натрия, 0,5%-й раствор глюкозы, индикатор Андреде и поплавок) проводят посевы различных объемов воды.

Воду открытых водоемов исследуют в объемах 100; 10; 1 и 0,1 мл. Для анализа водопроводной воды делают посевы трех объемов по 100 мл, трех объемов по 10 мл и трех объемов по 1 мл. Посевы инкубируют при 37 °С в течение суток. О брожении судят по образованию пузырьков газа в поплавке. Из забродивших или помутневших проб делают посевы на среду Эндо. Из выросших колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, с помощью которого дифференцируют бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter* от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. С этой целью 2...3 изолированные колонии наносят «штрихом» на фильтровальную бумагу, смоченную диметил-п-фенилендиамином. При отрицательном оксидазном тесте цвет бумаги не изменяется, при

положительном она окрашивается в синий цвет в течение 1 мин. Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном тесте — вносят в полужидкий питательный агар с 0,5 % глюкозы и инкубируют при 37 °С в течение суток. При положительном результате определяют коли-титр и коли-индекс по статистической таблице.

Метод мембранных фильтров. Определенный объем воды пропускают под давлением через мембранный фильтр № 3, предварительно стерилизованный кипячением в дистиллированной воде. Водопроводную воду и воду артезианских скважин фильтруют в объеме 333 мл. Чистую воду открытых водоемов фильтруют в объеме 100, 10, 1 и 0,1 мл, более загрязненную воду перед фильтрованием разводят стерильной водой. Фильтры накладывают на агар Эндо в чашки Петри и после инкубации при 37 °С в течение суток подсчитывают количество выросших красных колоний. Из двух-трех колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и ставят оксидазный тест. Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, принадлежат к БГКП. По существующим нормативам (ГОСТ 2874—82) питьевую воду считают качественной, если ее коли-индекс не более 3, а микробное число — не более 100.

40. Определение индекса бактерий группы кишечных палочек при исследовании воды

| Количество положительных результатов | | | Коли-индекс | Пределы индекса | | Коли-титр |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------|-----------------|---------|-----------|
| из 3 объемов по 100 мл | из 3 объемов по 10 мл | из 3 объемов по 1 мл | | нижний | верхний | |
| 0 | 0 | 0 | Менее 3 | — | — | Более 333 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 0,5 | 9 | 333 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 0,5 | 13 | 333 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 0,5 | 20 | 250 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 1 | 21 | 143 |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 150 | 4800 | 0,9 |
| 3 | 3 | 3 | Более 1100 | — | — | Менее 0,9 |

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

Есть данные о корреляции между содержанием в воде фекальных кишечных палочек и фагами бактерий группы кишечных палочек. Поэтому определение данных фагов служит косвенным

показателем возможного присутствия кишечных палочек в исследуемой пробе воды.

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

Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям: 1) определение микробного числа воздуха; 2) определение количества санитарно-показательных бактерий — гемолитических стрептококков и стафилококков.

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

Седиментационный метод осаждения Коха. Чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5...10 мин. Для определения санитарно-показательных бактерий берут чашки Петри с кровяным МПА и время экспозиции увеличивают до 40 мин. Чашки выдерживают при 37 °С и комнатной температуре 24 ч и подсчитывают выросшие колонии.

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

$$X = a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5 / (b \cdot 10 \cdot T),$$

где X — количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха; a — количество выросших колоний в чашках; b — площадь чашки; T — время, в течение которого чашка была открыта; 5 — время по правилу Омелянского; 10 — объем воздуха в литрах. (Правило Омелянского предусматривает, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см² за 5 мин из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в его 10 л.)

Прямое обнаружение патогенных микробов воздуха проводят только при специальных показаниях.

41. Санитарная оценка воздуха по бактериологическим показателям

| Воздух | Количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха | |
|----------------------|---|--|
| | общее | зеленящего и гемолитического стрептококков |
| <i>Летний режим:</i> | | |
| Чистый | 1500 | 16 |
| Загрязненный | 2500 | 36 |
| <i>Зимний режим:</i> | | |
| Чистый | 4500 | 36 |
| Загрязненный | 7000 | 124 |

Аспирационный метод. Более точный количественный способ определения микробного числа воздуха, так как посев микроорганизмов из воздуха производят с помощью приборов. При использовании аппарата Кротова воздух с заданной скоростью засасывается через щель плексигласовой пластины и ударяется о поверхность питательной среды открытой чашки Петри, находящейся на вращающейся подставке, благодаря чему происходит равномерный посев бактерий из воздуха на поверхность МПА (при определении микробного числа) или кровяного МПА (при выделении гемолитических стафилококков и стрептококков). После инкубации в термостате в течение двух суток подсчитывают количество выросших колоний и определяют микробное число воздуха. При исследовании воздуха могут быть использованы и другие приборы (Дьякова, Киктенко, ПАБ-1 — прибор аэрозольный бактериологический и ПОВ-1 — прибор для отбора воздуха). В практику входят ускоренные методы индикации микробов воздуха с помощью мембранных фильтров, каскадных импакторов, фильтров Петрякова и др.

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

Предварительно делают отбор проб почвы. На обследуемой территории площадью до 1000 м² выделяют два участка по 25 м² (один — вблизи источника загрязнения, другой — в отдалении от него), берут пробы из 5 точек (4 — по углам участка, 1 — в центре) на глубине 10...20 см стерильным совком (из более глубоких мест — с помощью специального бура Некрасова или Френкеля). Пробы почвы по 200...300 г отбирают в широкогорлые стеклянные банки с ватными пробками (можно все взятые с одного участка пробы перемешать и на исследование направить 1 кг). На банки наклеивают этикетки, отправляют с нарочным и сопроводительным письмом. Пробы почвы полагается исследовать сразу же или в течение 6...18 ч, сохраняя их при температуре не выше 1...5 °С.

В лаборатории почву измельчают, освобождают от камней, осколков стекла, корней растений, просеивают через сито, тщательно перемешивают и отвешивают 30 г. В колбу на 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят в нее отвешенную пробу почвы, все интенсивно встряхивают 10 мин, не давая отстояться частицам суспензии, готовят серию десятикратных последовательных разведений. Для относительно чис-

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

Определение общего микробного числа. Из последних 3...4 пробирок с разведенной суспензией отдельными стерильными пипетками вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри (каждое разведение в отдельности). В каждую чашку добавляют еще по 10...15 мл расплавленного и охлажденного до 45 °С МПА. Равномерными осторожными круговыми движениями содержимое чашек перемешивают, оставляют на столе для уплотнения (затвердения) агара. С застывшей средой чашки перевертывают вверх дном, надписывают и помещают в термостат для культивирования на 24...48 ч при 37 °С. Выросшие колонии подсчитывают в каждой чашке, умножают на степень разведения, полученные числа суммируют и вычисляют среднеарифметическое число, что составит количество микробов, содержащихся в 1 г почвы.

Определение коли-титра, перфрингенс-титра и титра термофильных бактерий почвы. Для определения коли-титра почвы различные разведения почвенной взвеси засевают по 1 мл в пробирки со средой Кесслера (на 1 л дистиллированной воды — 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи — 2,5 г лактозы, 4 мл 1%-го водного раствора генцианвиолета) и инкубируют при 43 °С в течение 48 ч. В дальнейшем исследования проводят по схеме, применяемой при определении коли-титра воды. Наибольшее разведение почвенной суспензии, в котором отмечена ферментация лактозы (газообразование), соответствует коли-титру почвы. Для определения перфрингенс-титра почвы различные разведения почвенной суспензии по 1 мл засевают в пробирки со стерильным обезжиренным молоком или железосульфитной средой Вильсона—Блера, приготовленной *ex tempore*. Посевы инкубируют при 43 °С в течение 24...48 ч, после чего учитывают результаты по свертыванию молока или по образованию черных колоний *S. perfringens* в агаровом столбике среды Вильсона—Блера. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр, который соответствует наибольшему разведению почвы, вызвавшему почернение и разрыв среды Вильсона—Блера в первые 12 ч роста.

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

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по

комплексу показателей, из которых наиболее важный — установление степени фекального загрязнения.

42. Оценка санитарного состояния почвы по основным микробиологическим показателям

| Характеристика почвы | Коли-титр | Перфрингенс-титр | Количество термофильных бактерий в 1 г почвы |
|----------------------|--------------|------------------|--|
| Чистая | 1,0 и выше | 0,01 и выше | 100...1000 |
| Загрязненная | 0,9...0,01 | 0,009...0,0001 | 1000...100 тыс. |
| Сильно загрязненная | 0,009 и ниже | 0,00009 и ниже | 100 тыс....4 млн |

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Определить микробное загрязнение воздуха.
2. Провести исследование воды с целью установления микробного числа и коли-титра.
3. Определить микробное число и перфрингенс-титр почвы.

Контрольные вопросы

1. Что такое санитарно-показательные микроорганизмы?
2. Как определяют коли-титр воды?
3. Как определяют микробное число почвы?
4. Как определяют перфрингенс-титр почвы?
5. Какие методы применяют для определения микробного числа воздуха?
6. Что такое санитарно-показательные микробы воздуха и как их определяют?

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----|
| Раздел I. Общая микробиология: морфология, физиология и генетика микроорганизмов | 3 |
| Тема 1. Ветеринарно-бактериологическая лаборатория. Техника микроскопирования. Основные формы бактерий. Определение размеров микроорганизмов | 3 |
| Тема 2. Бактериологические красители. Приготовление бактериальных препаратов для световой микроскопии. Простые методы окраски бактерий .. | 21 |
| Тема 3. Сложные методы окраски бактерий: окраска по методам Грама и Циля—Нильсена | 24 |
| Тема 4. Окраска бактерий с целью выявления спор, капсул, цитоплазматических включений. Методы обнаружения жгутиков. Метод прямого флуорохромирования бактерий | 26 |
| Тема 5. Микроскопические грибы | 34 |
| Тема 6. Стерилизация | 41 |
| Тема 7. Питательные среды и культивирование микроорганизмов | 51 |
| Тема 8. Техника посева, методы выделения чистых культур и культуральные свойства микроорганизмов. Определение количества бактерий | 66 |
| Тема 9. Ферментативные (биохимические) свойства и принципы идентификации микроорганизмов | 77 |
| Тема 10. Бактериофаги | 82 |
| Тема 11. Антибиотики. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам | 85 |
| Тема 12. Генетика и генетические методы идентификации микроорганизмов | 89 |
| Раздел II. Инфекция и методы прикладной иммунологии | 99 |
| Тема 13. Экспериментальное заражение лабораторных животных. Определение вирулентности и факторов патогенности микроорганизмов | 99 |
| Тема 14. Методы определения факторов неспецифической резистентности и оценки иммунного статуса макроорганизма | 109 |
| Тема 15. Серологические реакции: агглютинации (РА), непрямой гем-агглютинации (РНГА), Кумбса (РК). Оборудование для постановки серологических реакций | 118 |
| Тема 16. Реакции преципитации (РП): кольцепреципитации (РКП), диффузионной преципитации (РДП); иммуноэлектрофорез | 126 |
| Тема 17. Реакция связывания комплемента (РСК) | 134 |
| Тема 18. Метод флуоресцирующих антител (МФА). Иммуноферментный анализ (ИФА) | 141 |
| Тема 19. Реакция нейтрализации (РН) | 147 |
| Тема 20. Средства специфической профилактики, терапии и диагностики инфекционных болезней | 150 |
| Тема 21. Отбор, консервирование, транспортировка и хранение материала для микробиологического исследования. Принципиальная схема микробиологической диагностики инфекционных болезней | 159 |
| Раздел III. Частная микробиология | 165 |
| Тема 22. Лабораторная диагностика стафилококкозов и стрептококкозов. Биопрепараты | 165 |
| Тема 23. Лабораторная диагностика рожи свиней и листериоза. Биопрепараты | 172 |
| Тема 24. Лабораторная диагностика туберкулеза, паратуберкулеза, актиномикоза. Биопрепараты | 179 |
| Тема 25. Лабораторная диагностика сибирской язвы. Биопрепараты | 189 |
| Тема 26. Лабораторная диагностика злокачественного отека, анаэробной дизентерии ягнят, браззота, инфекционной энтеротоксемии, эмфизематозного карбункула. Биопрепараты | 196 |
| Тема 27. Лабораторная диагностика столбняка, ботулизма. Биопрепараты | 209 |
| Тема 28. Лабораторная диагностика некробактериоза и копытной гнили. Биопрепараты | 214 |
| Тема 29. Лабораторная диагностика эшерихиозов (коли-инфекции). Биопрепараты | 217 |
| Тема 30. Лабораторная диагностика сальмонеллеза. Биопрепараты | 222 |
| Тема 31. Лабораторная диагностика чумы верблюдов и человека, псевдотуберкулеза. Биопрепараты | 233 |
| Тема 32. Лабораторная диагностика бруцеллеза, туляремии. Биопрепараты | 237 |
| Тема 33. Лабораторная диагностика пастереллеза, гемофильного полисерозита и актинобациллезной пневмонии свиней. Биопрепараты | 247 |
| Тема 34. Лабораторная диагностика сапа, мелиоидоза и псевдомоноза норки. Биопрепараты | 255 |
| Тема 35. Лабораторная диагностика лептоспироза, кампилобактериоза и дизентерии свиней. Биопрепараты | 262 |
| Тема 36. Лабораторная диагностика микоплазмозов, риккетсиозов и хламидиозов. Биопрепараты | 276 |
| Тема 37. Лабораторная диагностика дерматомикозов, микозов, вызываемых плесневыми и дрожжеподобными грибами. Биопрепараты | 291 |
| Тема 38. Лабораторная диагностика микотоксикозов, вызываемых грибами родов <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Dendrodochium</i> | 314 |
| Тема 39. Санитарно-микробиологическое исследование воды, воздуха и почвы | 332 |

Учебное издание

**Костенко Тамара Стефановна,
Родионова Валентина Борисовна,
Скородумов Дмитрий Иванович**

**ПРАКТИКУМ
ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
И ИММУНОЛОГИИ**

Учебное пособие для вузов

Художественный редактор **Н. Л. Минаева**
Технические редакторы **Н. А. Зубкова, Н. Н. Зиновьева**
Корректор **Л. Г. Новожилова**

Лицензия № 010159 от 06.03.97 г.

Сдано в набор 16.06.2000. Подписано в печать 25.01.2001. Формат 60x88 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Ньютон. Печать офсетная. Усл. п. л. 21,07.
Уч.-изд. л. 21,8. Изд. № 061. Тираж 3000 экз. Заказ 2535 «С» № 007.

Федеральное государственное ордена Трудового Красного Знамени
унитарное предприятие «Издательство «Колос»,
107996, ГСП-6, Москва, Б-78, ул. Садовая-Спасская, 18.

Типография ОАО «Внешторгиздат»,
127576, Москва, Илимская, 7.

ISBN 5-10-003507-2



9 785100 035077

**Издательство «Колос»
в 2001 г.
планирует выпустить в свет**

**ОПЕРАТИВНАЯ ХИРУРГИЯ
С ТОПОГРАФИЧЕСКОЙ АНАТОМИЕЙ**

**Петраков К. А., Саленко П. Т.,
Панинский С. М.**

Учебник состоит из двух частей — общей и специальной. В общей части рассмотрены: учение о хирургической операции, методы и средства местного и общего обезболивания, профилактика инфекционных осложнений и кровотечений, инъекции, инфузии, кровопускания, катетеризация и дисмургия. В специальной части описана топографическая анатомия оперируемых животных разных видов.

Для студентов вузов по специальности «Ветеринария». 36 л., ил. 2001

Заказать книгу можно в издательстве
по почте или факсу

Адрес издательства: 107996, ГСП-6, Москва, Б-78, ул.
Садовая-Спасская, 18.

Телефон отдела реализации (комн. 206):
(095) 207-65-18; факс 207-28-70
