

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

*Рекомендовано учебно-методическим объединением
по образованию в области сельского хозяйства
в качестве учебно-методического пособия для студентов
учреждений высшего образования, обучающихся
по специальности 1-74 03 01 Зоотехния*

Горки
БГСХА
2017

УДК 619:613.636.083(075.8)
ББК 48я73
М59

*Одобрено методической комиссией факультета
биотехнологии и аквакультуры 26.01.2017 (протокол № 5)
и Научно-методическим советом БГСХА 31.01.2017 (протокол № 5)*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Т. В. Соляник*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *М. А. Гласкович*;
доктор ветеринарных наук, профессор *П. А. Красочко*;
доктор биологических наук, профессор *Л. Ю. Карпенко*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Гласкович*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Вербицкий*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *П. П. Красочко*

Под редакцией *М. А. Гласкович*

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор *И. И. Генералов*;
кандидат биологических наук *С. М. Дегтярик*;
кандидат ветеринарных наук *Т. М. Скудная*

М59 : учебно-методическое пособие. В 2 ч. Ч. 1.
М59 Микробиология / Т. В. Соляник [и др.]. – Горки : БГСХА,
2017. – 200 с. : ил.

ISBN 978-985-467-673-9.

Приведена систематика и морфология микроорганизмов, описана наследственность и распространение микроорганизмов в природе, даны основы учения об инфекции. Подробно описано определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Приведены современные сведения по классификации, номенклатуре и репродукции вирусов. Рассмотрена природа, происхождение вирусов. Раскрыта специфическая профилактика и меры борьбы с вирусными болезнями, приведены биопрепараты для серологической диагностики.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-74 03 01 Зоотехния.

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2017

Геологией доказано, что возраст Земли составляет 4,5–4,6 млрд. лет. По мнению ученых, около 3,8 млрд. лет тому назад жизнь стала основным фактором круговорота углерода на планете. Первыми появились организмы, которые современная наука называет прокариотами. Это одноклеточные существа, по сравнению с многоклеточными организмами отличающиеся простотой строения и функций. К ним относят бактерии и сине-зеленые водоросли. С эволюцией названных микроорганизмов связывают появление механизма фотосинтеза и организмов эукариотического типа.

Представителей живой природы условно можно разделить на существ, относящихся к макромиру и микромиру. К макромиру относятся животные всех видов: птицы, насекомые, гельминты и т. д., к микромиру – бактерии, вирусы, риккетсии, микоплазмы, грибы, простейшие, прионы, нуклеиновые кислоты (инфекционные ДНК и РНК). Бактерии, грибы, простейшие являются одноклеточными представителями микромира, и к ним применим термин «микроорганизмы», так как они представляют собой самостоятельные, способные к автономному существованию организмы.

Вирусы, прионы, нуклеиновые кислоты (инфекционные ДНК и РНК) не являются организмами в полном смысле этого слова в связи с тем, что не имеют оргanelл, не обладают собственным метаболизмом, используют для своей жизнедеятельности ресурсы клеток животных, человека, растений.

Объединяющим термином для всех форм микромира является термин «микробы». На нашей планете обитает огромное количество микробов, исчисляемое астрономическими цифрами. В процессе своей жизнедеятельности микробы оказывают существенное влияние на неживую и живую природу. Известно, что бактерии обеспечивают круговорот веществ и энергии в природе, плодородие почв, поддержание газового состава и т. д.

Мир микробов изучает микробиология – наука о микробах. Она делится на ряд отделов и дисциплин. Вследствие процесса дифференциации, постепенного обособления узких областей изучения и познания микробов родилась генетика микроорганизмов – наука, изучающая их наследственность и изменчивость.

Микроорганизмы обитают во всех климатических зонах, находятся на всех предметах и продуктах, живут в организме человека. Они разлагают остатки отмерших животных и растительных тканей, выполняя роль санитаров планеты. С жизнедеятельностью микроорганизмов связаны образование полезных ископаемых, плодородие почвы, самоочищение водоемов и т. д. Полезные свойства микроорганизмов используются в технологии производства многих пищевых продуктов и различных биологически активных веществ, таких как ферменты, аминокислоты, витамины, антибиотики и др.

Однако не все микроорганизмы приносят пользу. Многие микробы болезнетворны для человека, животных, птиц, насекомых, растений. Многие микроорганизмы являются вредителями пищевых производств и вызывают порчу пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья. Некоторые микроорганизмы, развиваясь и размножаясь в пищевых продуктах, образуют токсины и вызывают пищевые отравления.

Среди микроорганизмов имеется особая группа – патогенные (болезнетворные) микробы, которые, попадая в организм человека через пищевые продукты, способны вызвать пищевые инфекционные заболевания (алиментарные инфекции).

Особую группу ультрамикроскопических структур, не имеющих клеточного строения и отличающихся по химическому составу от всех микроорганизмов, представляют вирусы и бактериофаги. Положение вирусов и фагов в системе живых организмов до сих пор остается неясным. Вирусы являются внутриклеточными паразитами клеток и вызывают разнообразные болезни человека, животных и растений. Бактериофаги паразитируют в клетках бактерий и вызывают их лизис, нанося огромный вред при производстве пищевых продуктов и биологически ценных веществ, основанном на жизнедеятельности полезной микрофлоры (например, при производстве кисломолочных продуктов, антибиотиков, бактериальных ферментов и т. д.).

Общими свойствами микроорганизмов являются:

- *малые размеры* (размеры микроорганизмов измеряются в микрометрах, $1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$);

- *высокая скорость обменных процессов*. Это связано с большим отношением поверхности обмена к объему клетки. Для микроорганизмов вся поверхность клетки является поверхностью обмена. Так как клетки бактерий самые мелкие, то они растут и развиваются быстрее всех микроорганизмов, за ними следуют дрожжи и грибы. В свою очередь, скорость обменных процессов у микроорганизмов в десятки и

сотни тысяч раз выше, чем у животных. Например, в организме одного быка массой в 500 кг за 24 ч образуется примерно 0,5 кг белка; за это же время 500 кг дрожжей могут синтезировать более 50 000 кг белка;

- *широкое распространение в природе*. Малые размеры микроорганизмов имеют значение для экологии. Микроорганизмы могут распространяться с воздушными потоками и существуют повсюду;

- *пластичность обмена* – высокая способность к адаптации (приспособлению к новым условиям существования). Большая гибкость обменных процессов у микроорганизмов по сравнению с растениями и животными объясняется их способностью синтезировать индуцибельные ферменты, т. е. ферменты, которые образуются в клетке только при наличии в среде соответствующих веществ;

- *высокая степень изменчивости*. Более высокая степень изменчивости микроорганизмов по сравнению с макроорганизмами связана с тем, что большинство микроорганизмов является одноклеточными организмами. На отдельную клетку воздействовать легче, чем на организм, состоящий из множества клеток.

Высокая степень изменчивости, быстрый рост и развитие, высокая скорость обменных процессов, образование многочисленного потомства – все эти свойства микроорганизмов делают их чрезвычайно удобными объектами для генетического анализа, так как опыты можно проводить в короткие сроки на огромном числе особей.

Настоящее учебно-методическое пособие составлено в соответствии с программой по дисциплине «Микробиология» для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений, обучающихся по специальности 1-74 03 01 Зоотехния. Программа дисциплины «Микробиология» предусматривает изучение принципов систематики, морфологии и физиологии, широты распространения микроорганизмов в природе и их роли в превращении веществ; изучение действия факторов внешней среды на прокариотические клетки; овладение основами учения об инфекции и иммунитете, наследственности, изменчивости, биологии и экологии микроорганизмов; освоение принципов идентификации патогенных для животных бактерий, вирусов и грибов; освоение бактериологических, серологических, микологических и вирусологических исследований, используемых при диагностике инфекционных болезней.

В задачи дисциплины входят: изучение микроорганизмов как части биосферы, их распространения и роли в круговороте веществ и энергии в природе; систематики и классификации основных групп микро-

организмов; особенностей строения вирусов; морфологии, физиологии и экологии микроорганизмов; влияния факторов внешней среды на микроорганизмы; инфекций и иммунитета; микрофлоры тела животных, возбудителей инфекционных болезней животных; микробиологии кормов, молока и молочных продуктов; микрофлоры мяса, яиц, кожевенно-мехового сырья; микробиологии навоза.

Цель учебной дисциплины – формирование у будущих зооинженеров научного мировоззрения о многообразии микроорганизмов, их роли в общебиологических процессах и в патологии животных, освоение теоретических и практических основ диагностики инфекционных болезней, принципов иммунологических исследований.

Хотя данное учебно-методическое пособие предназначено для студентов, для которых микробиология не является основным предметом их будущей специализации, тем не менее, они должны иметь представление о разнообразии мира микробов и о той роли, которую микроорганизмы играют в поддержании жизни на Земле. Специалисты таких отраслей, как биотехнология, сельское хозяйство, агрономия, зоотехния, ветеринария, пищевая и рыбная промышленность, почвоведение и др., имеют дело с микроорганизмами при приготовлении и консервировании кормов, компостировании сельскохозяйственных отходов, обработке почвы и ее мелиорации, получении органических удобрений, переработке плодов и овощей.

Авторы пособия благодарят рецензентов за ценные советы и замечания.

ознакомиться с техникой безопасности и правилами работы в микробиологической лаборатории и ее оборудованием, с методами исследований, применяемыми в микробиологической практике, с устройством светового микроскопа и принципами работы с ним.

микроскопы оптический и люминесцентный; рисунки с устройством микроскопа; иммерсионное масло, нефлуоресцирующее масло; журнал по технике безопасности; мазки-препараты.

(от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов, мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, не видимых невооруженным глазом.

всех представителей микромира (бактерии, грибы, простейшие, вирусы). По своей сути микробиология является биологической фундаментальной наукой. Для изучения микроорганизмов она использует методы других наук, прежде всего физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии. Как и всякая наука, микробиология подразделяется на общую и частную. Общая микробиология изучает закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на всех уровнях: молекулярном, клеточном, популяционном; генетику и взаимоотношения их с окружающей средой. Предметом изучения частной микробиологии являются отдельные представители микромира в зависимости от проявления и влияния их на окружающую среду, живую природу, в том числе человека. К частным разделам микробиологии относятся: медицинская, ветеринарная, сельскохозяйственная, техническая (раздел биотехнологии), морская, космическая микробиология.

1. Знание свойств микроорганизмов позволяет своевременно принимать меры, направленные на *предотвращение роста и развития микроорганизмов* при производстве, транспортировании пищевых продуктов. Это создает предпосылки для повышения биологической стойкости пищевой продукции в процессе ее хранения.

2. Выделение чистых культур из различных объектов окружающей среды, их селекция, получение высокопродуктивных мутагенных штаммов, оптимизация основных параметров культивирования микроорганизмов позволяют *интенсифицировать технологические процессы*, основанные на жизнедеятельности полезной микрофлоры. В свою очередь, повышение активности технически полезных микроорганизмов способствует подавлению вредной микрофлоры и улучшению качества пищевых продуктов.

3. Одной из основных задач микробиологии пищевых производств является обеспечение *выпуска продуктов питания, безопасных для здоровья потребителей*. Для этого необходимо знать микробиологические критерии безопасности различных групп пищевых продуктов и уметь проводить микробиологический контроль в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами.

4. Благодаря изучению свойств микроорганизмов стало возможным *создание технологических процессов*, которые либо совсем не дают отходов (*безотходные технологии*), либо в основе которых лежат замкнутые циклы, т. е. все отходы полностью перерабатываются или используются на последующих стадиях производства. Таким образом, с помощью микробиологии успешно решаются вопросы, связанные с охраной окружающей среды.

изучает патогенные для человека микроорганизмы: бактерии, вирусы, грибы, простейшие. В зависимости от природы изучаемых патогенных микроорганизмов медицинская микробиология делится на бактериологию, вирусологию, микологию, протозоологию.

Каждая из этих дисциплин рассматривает следующие вопросы:

- морфологию и физиологию, т. е. осуществляет микроскопические и другие виды исследований, изучает обмен веществ, питание, дыхание, условия роста и размножения, генетические особенности патогенных микроорганизмов;

- роль микроорганизмов в этиологии и патогенезе инфекционных болезней;

- основные клинические проявления и распространенность вызываемых заболеваний;

- специфическую диагностику, профилактику и лечение инфекционных болезней;

- экологию патогенных микроорганизмов.

К медицинской микробиологии относят также санитарную, клиническую и фармацевтическую микробиологию.

изучает микрофлору окружающей среды, взаимоотношение микрофлоры с организмом, влияние микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности на состояние здоровья человека, разрабатывает мероприятия, предупреждающие неблагоприятное воздействие микроорганизмов на человека.

В центре внимания – роль условно-патогенных микроорганизмов в возникновении заболеваний человека, диагностика и профилактика этих болезней.

исследует инфекционные болезни лекарственных растений, порчу лекарственных растений и сырья под действием микроорганизмов, обсемененность лекарственных средств в процессе приготовления, а также готовых лекарственных форм, методы асептики и антисептики, дезинфекции при производстве лекарственных препаратов, технологию получения микробиологических и иммунологических диагностических, профилактических и лечебных препаратов.

изучает те же вопросы, что и медицинская микробиология, но применительно к микроорганизмам, вызывающим болезни животных.

Микрофлора почвы, растительного мира, влияние ее на плодородие и состав почвы, инфекционные заболевания растений и т. д. – эти вопросы находятся в центре внимания

изучает соответственно микрофлору морей и водоемов и космического пространства и других планет.

, являющаяся частью биотехнологии, разрабатывает технологию получения из микроорганизмов разнообразных продуктов для народного хозяйства и медицины (антибиотики, вакцины, ферменты, белки, витамины). Основа современной биотехнологии – генетическая инженерия.

Многочисленные открытия в области микробиологии, изучение взаимоотношений между макро- и микроорганизмами во второй половине XIX в. способствовали началу бурного развития

Вначале иммунология рассматривалась как наука о невосприимчиво-

сти организма к инфекционным болезням. В настоящее время она стала общемедицинской и общебиологической наукой. Доказано, что иммунная система служит для защиты организма не только от микробных агентов, но и от любых генетически чужеродных организму веществ с целью сохранения постоянства внутренней среды организма, т. е. гомеостаза.

является основой для разработки лабораторных методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных и многих неинфекционных болезней, а также разработки иммунобиологических препаратов (вакцин, иммуноглобулинов, иммуномодуляторов, аллергенов, диагностических препаратов). Разработкой и производством иммунобиологических препаратов занимается иммунобиотехнология – самостоятельный раздел иммунологии.

Современная медицинская микробиология и иммунология достигли больших успехов и играют огромную роль в диагностике, профилактике и лечении инфекционных и многих неинфекционных болезней, связанных с нарушением иммунной системы (онкологические, аутоиммунные болезни, трансплантация органов и тканей и др.).

Роль микробиологии как науки определяется значением микроорганизмов в природных процессах и человеческой деятельности:

1) микроорганизмы участвуют в глобальном круговороте элементов, причем некоторые стадии невозможны без них, например, фиксация молекулярного азота, денитрификация или минерализация сложных органических веществ в анаэробных условиях;

2) на метаболизме микроорганизмов основан ряд необходимых человеку производств (например, хлебопечение, пивоварение, виноделие и др.);

3) микроорганизмы используются для очистки окружающей среды от различных природных и антропогенных загрязнений;

4) многие микроорганизмы являются возбудителями заболеваний человека, животных, растений, а также вызывают порчу продуктов питания и различных промышленных материалов.

История микробиологии исчисляется примерно с 1661 г., когда голландский торговец сукном Антони ван Левенгук впервые описал микроскопических существ, наблюдаемых им в микроскоп собственного изготовления. Он описал их основные группы, а также сделал вывод о том, что они вездесущи. Этот период истории микробиологии можно условно назвать описательным.

Физиологический этап развития микробиологии начался приблизительно с середины XIX в. и связан, прежде всего, с именами французского химика-кристаллографа Луи Пастера и немецкого сельского врача Роберта Коха. Эти ученые положили начало экспериментальной микробиологии и существенно обогатили методологический арсенал этой науки.

Л. Пастер доказал, что причиной химических изменений субстратов являются микроорганизмы, и опроверг теорию их самозарождения. Исследования природы брожений стали продолжением работы по выяснению причины прокисания вина. Л. Пастер показал, что каждое брожение имеет главный конечный продукт и вызывается микроорганизмами определенного типа. Эти исследования привели к открытию неизвестного ранее «образа жизни» – анаэробного метаболизма. Изучая на примере дрожжей возможность переключения с одного типа обмена веществ на другой, Л. Пастер показал, что анаэробный метаболизм энергетически менее выгоден. Работы по изучению возбудителей «болезней» пива и вина позволили Л. Пастеру предложить способ тепловой обработки этих продуктов, предохраняющий их от порчи, получивший название «*пастеризация*». Они же навели ученого на мысль о том, что микроорганизмы, возможно, являются возбудителями и инфекционных болезней человека.

Исследования микробной природы многих заболеваний человека в дальнейшем велись институтами Л. Пастера (в Париже) и Р. Коха (в Берлине) параллельно.

Р. Кох, начав с доказательства бактериальной этиологии сибирской язвы, затем выделил возбудителей многих болезней в чистой культуре (среди них *Mycobacterium tuberculosis*, или палочка Коха).

Ученый окончательно сформулировал триаду, получившую его имя, для доказательства микробной этиологии заболевания:

- 1) микроорганизм должен присутствовать в материале, выделенном от больного;
- 2) выделенный в чистой культуре микроорганизм должен вызывать ту же болезнь;
- 3) при экспериментально вызванном повторном заболевании возбудитель должен снова быть выделен в чистую культуру, и две эти чистые культуры должны быть идентичными.

В лаборатории Р. Коха в практику эксперимента были введены методы получения чистых культур, а также использование в микробиологических исследованиях твердых сред на основе сначала желатина, а затем и агара. Знаменитая чашка Петри и бактериальные фарфоровые

фильтры Шамберлана также изобретены сотрудниками института Р. Коха.

Признание огромной роли микроорганизмов в биологически важных круговоротах элементов на Земле связано с именами Сергея Николаевича Виноградского и Мартинуса Бейеринка.

С. Н. Виноградскому принадлежит открытие уникального «образа жизни» – *хемолитоавтотрофии* и изучение серных и нитрифицирующих бактерий. С. Н. Виноградский и М. Бейеринк независимо друг от друга показали, что молекулярный азот способны фиксировать только микроорганизмы, и выделили свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов. С. Н. Виноградским разработан также метод накопительных культур.

С. Н. Виноградский и М. Бейеринк являются основоположниками экологического направления микробиологии, связанного с изучением роли микроорганизмов в природных условиях и участием их в круговороте веществ в природе.

На рубеже XIX–XX вв. Дмитрий Иванович Ивановский открыл вирус табачной мозаики, тем самым обнаружив особую группу биологических объектов, не имеющих клеточного строения. Д. И. Ивановский положил начало вирусологии, выросшей в самостоятельную область науки. Открытие вирусов сыграло огромную роль в развитии ряда научных дисциплин: биологии, медицины, ветеринарии и фитопатологии. Оно позволило расшифровать этиологию таких заболеваний, как бешенство, оспа, энцефалиты, и многих других.

В XX в. микробиология развивалась, опираясь, в том числе, и на открытия, сделанные в других областях биологии.

Развитие отечественной микробиологии в XX в. представлено различными направлениями и деятельностью многих ученых с мировым именем. Перечислим лишь некоторые из них.

Большой вклад в геносистематику микроорганизмов внесли А. Н. Белозерский и А. С. Спирин, которые успешно проводили исследования состава РНК и ДНК растений и микроорганизмов. Результаты этих исследований привели к становлению молекулярной биологии и геносистематики.

В. Н. Шапошников является основателем отечественной технической микробиологии. Его работы по физиологии микроорганизмов посвящены изучению различных видов брожения. Он создал теорию физиологической двухфазности брожений, что позволило управлять процессами получения важных продуктов в микробиологических производствах.

Физиология и биохимия многих фототрофных и хемолитотрофных микроорганизмов были подробно изучены Е. Н. Кондратьевой с сотрудниками.

Экологическое направление микробиологии представлено работами В. Л. Омелянского, который разработал схемы круговорота веществ в природе и изучил жизнедеятельность микроорганизмов, участвующих в глобальных циклах азота (нитрификаторы и азотфиксаторы), серы (гнилостные, сульфатредуцирующие и тионовые бактерии) и железа (железобактерии). Методы прижизненного наблюдения микроорганизмов, внедренные в микробиологическую практику, – капилляры Перфильева, стекла обрастания Росси – Холодного, почвенная камера и метод проращивания почвенной пыли по Холодному – активно используются и в настоящее время.

Роль микробных сообществ в разных природных и искусственных местообитаниях изучаются М. В. Ивановым и Г. А. Заварзиным с сотрудниками.

В области управляемого культивирования микроорганизмов Н. Д. Иерусалимским была разработана теория роста и развития микробов.

В современной микробиологии развиты следующие основные направления:

1) фундаментальные исследования (выяснение путей метаболизма, выделение, очистка ферментов, регуляция обмена веществ и т. д.);

2) систематика микроорганизмов и построение филогенетических древ;

3) экологическая микробиология (роль микроорганизмов в природных экосистемах и пищевых цепях);

4) популяционная микробиология (выяснение природы межклеточных контактов и взаимосвязь клеток в популяции);

5) медицинская, ветеринарная и сельскохозяйственная микробиология;

6) техническая (промышленная) микробиология (включает все практические аспекты).

Необходимо иметь в виду, что многие исследования проходят на стыке дисциплин (например, молекулярная микробиология, генная инженерия).

Основными методами микробиологических исследований являются следующие:

1) микроскопия (световая, люминесцентная, электронная, лазерная);

- 2) выделение чистых культур и контролируемое культивирование микроорганизмов;
- 3) аналитические методы (физиолого-биохимические, генетические и т. д.);
- 4) молекулярно-биологические методы (в том числе обнаружение микроорганизмов без выделения в чистые культуры).

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.

2. Изучить устройство и правила настройки светового микроскопа.

Работа проводится в специальных лабораториях. Необходимо строго соблюдать правила для обеспечения как личной безопасности, так и безопасности окружающих.

1. Запрещается работать в лаборатории без халатов и шапочек, выпускать из-под одежды волосы, воротнички.

2. Запрещается входить в учебные лаборатории в головных уборах и верхней одежде.

3. Запрещается курить, принимать пищу в учебных лабораториях кафедры.

4. Запрещается класть на стол сумки, одежду.

5. Весь материал, с которым предстоит работать, должен рассматриваться как инфицированный.

6. При работе с исследуемым материалом или с культурами микроорганизмов необходимо строго соблюдать следующие технические приемы:

- перед работой тщательно проверить целостность стеклянной посуды;

- не прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках;

- работать только с помощью инструментов (пинцеты, бактериологические петли, иглы, корнцанги и пр.);

- при посеве материала сделать надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с указанием номера анализа, культуры и даты посева;

- не наклоняться близко над спиртовкой и не протягивать над огнем руки;

- не зажигать спиртовку от другой горящей спиртовки, это можно делать только с помощью спичек;

- растворы, содержащие микроорганизмы, набирать в пипетку с помощью резиновой груши; пипетировать ртом и переливать растворы из сосуда в сосуд через край запрещается.

7. О случаях аварии с посудой, содержащей заразный материал, или о пролипании заразного материала необходимо немедленно сообщить преподавателю и вместе с ним провести мероприятия по обеззараживанию загрязненной одежды, частей тела, предметов рабочего места.

1. Каждый студент имеет постоянное рабочее место в лаборатории. Из личных вещей на рабочем месте допускается наличие только данного пособия и рабочей тетради, в которой делаются записи и зарисовки. Ничего лишнего (в том числе учебников и других книг) на рабочем столе не должно быть. Сумки, книги, другие личные вещи следует положить в стол.

2. Материал для работы на занятии принимает каждый дежурный по группе у лаборанта кафедры под залог документа (студенческий билет или зачетная книжка), микроскопы выдаются только под залог зачетной книжки.

3. До начала работы необходимо проверить рабочее место, состояние микроскопа, о недостатках сообщить дежурным студентам и преподавателю.

4. Во время занятия дежурный раздает материал под контролем преподавателя. Дежурные принимают учебный материал и распределяют его студентам.

5. Перед началом работы студент обязан надеть медицинский халат. Следует работать аккуратно, экономно расходовать материалы и реактивы, по окончании работы гасить спиртовку.

6. Необходимо во время работы содержать рабочее место в порядке; бережно обращаться с микроскопом и другим оборудованием; при посевах микробов не ходить, не разговаривать; на всех посевах (в пробирках, чашках) делать надписи, содержащие фамилию, курс, группу, дату, объект посева; все использованные пипетки и предметные стекла-мазки опускать в банку с дезинфицирующим раствором, находящуюся на рабочем столе.

1. В конце занятия надо привести в порядок рабочее место. Все

предметы на рабочем столе разместить в том порядке, в каком они были до работы.

2. Все посевы в чашках и пробирках сдать дежурным (дежурные помещают их в термостат).

3. Отработанный материал (культуры, микробный материал и др.) поместить в бикс для обеззараживания путем автоклавирования.

4. Привести в порядок микроскоп: салфеткой тщательно протереть иммерсионный объектив от масла, перевести револьвер объектива на $\times 8$, подложить под него салфетку, слегка прижав объективом к предметному столику, и, при необходимости, поставить микроскоп на полку или в шкаф.

5. Обработать руки дезинфицирующим раствором и тщательно вымыть их с мылом.

6. Хранение, отпуск, обеззараживание (уничтожение) материалов осуществляется преподавателями и лаборантами согласно соответствующим инструкциям.

7. Сдать лабораторию лаборантам.

Микробиологическая лаборатория – это помещение, в котором проводят микробиологические исследования. Микробиологическая лаборатория должна иметь: достаточное количество посуды и других материалов (колбы, пробирки, цилиндры, чашки Петри, пипетки и др.); предметные и покровные стекла; бактериологические петли, пастеровские пипетки; питательные среды; растворы красок для окрашивания препаратов; штативы; газовые горелки; термостаты; анаэроостаты, стерилизаторы сухожаровые; стерилизаторы паровые; водяную баню с терморегулятором; холодильники и морозильные камеры; центрифуги.

Термостаты используются для культивирования микроорганизмов при стабильной температуре (25, 37, 43 °C и др.) в зависимости от температурного оптимума микробов данного вида.

Анаэроостаты используются для культивирования анаэробов.

Стерилизаторы сухожаровые (сушильные шкафы, печи Пастера) предназначены для стерилизации металлических, фарфоровых и стеклянных предметов. Режим стерилизации – 160–200 °C.

Стерилизаторы паровые (автоклавы, аппараты Коха) используются для стерилизации пробирок, колб, ватных тампонов, игл и шприцев в герметических упаковках, а также питательных сред и растворов, химический состав которых не изменяется при высоких температурах.

Водяная баня с терморегулятором применяется для дробной стерилизации – тиндализации.

Холодильники и морозильные камеры служат для хранения исследуемых культур микроорганизмов, питательных сред, патологического и других исследуемых материалов. Для длительного хранения микробов применяют замораживание (от -20 до -40 °С).

Центрифуги применяются для осаждения микробов в жидкостях: в смывах микробной массы с плотных питательных сред, микроорганизмов, выращенных на жидких питательных средах, и др.

Микробиологические методы позволяют определить вид выделенного микроорганизма и осуществить диагностику данного заболевания. При изучении микроорганизмов применяют следующие методы лабораторной диагностики.

1. С помощью этого метода устанавливают морфологические свойства микробов в препаратах-мазках, приготовленных из микробных культур и исследуемого материала: а) форма микроба; б) размер; в) взаимное расположение; г) наличие спор и капсул; д) подвижность.

2. Основан на проведении и посеве микробов на искусственные обычные или специальные питательные среды с целью выделения чистой культуры и изучения ее свойств.

3. Применяется для определения патогенности, токсикогенности микроорганизмов. Осуществляется путем заражения различными методами чувствительных, лабораторных или других животных.

4. Основан на обнаружении специфических иммунных тел в сыворотке крови больных животных с помощью стандартных специфических иммунных сывороток, содержащих антитела против определенного вида микробов.

При изучении морфологии микроорганизмов обычно используют световые микроскопы Биолам и МБС-1 (рис. 1), М-11 и МБР-1 (рис. 2). Световой микроскоп – сложный оптический прибор, предназначенный для изучения в увеличенном изображении мельчайших микроорганизмов, не видимых невооруженным глазом. Световым он называется потому, что изучение объектов осуществляется в проходящем дневном или электрическом свете.

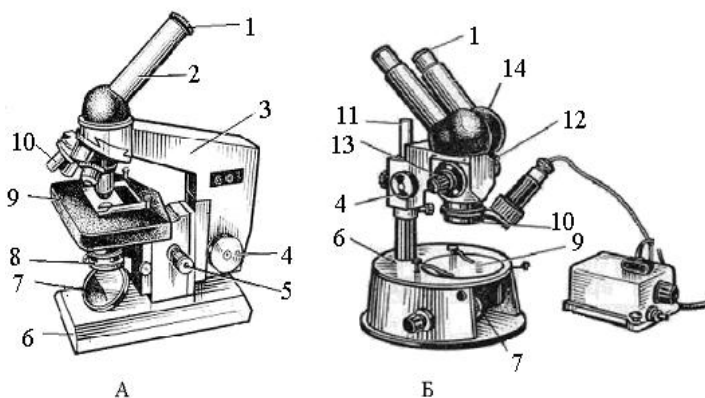


Рис. 1. Устройство микроскопов: *А* – Биолом; *Б* – МБС-1;
 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – тубусодержатель; 4 – винт грубой наводки; 5 – микрометричный винт; 6 – подставка; 7 – зеркало; 8 – конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр; 9 – предметный столик; 10 – объектив; 11 – стойка; 12 – оптическая головка; 13 – рукоятка переключения увеличения; 14 – бинокулярная насадка

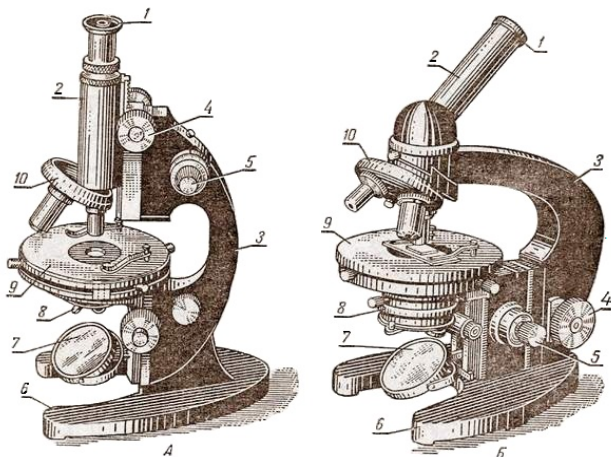


Рис. 2. Общий вид биологических микроскопов:
А – микроскоп М-11; *Б* – микроскоп МБР-1; 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – тубусодержатель; 4 – кремальера грубой наводки; 5 – микрометрический винт; 6 – основание штатива; 7 – зеркало; 8 – конденсор и ирисовая диафрагма; 9 – подвижный предметный столик; 10 – револьвер с объективами

Световой микроскоп состоит из двух частей.

1. Механическая часть состоит из подковообразного штатива, состоящего из ножки микроскопа (основание); колонки с прикрепленным к ней предметным столиком; кронштейна конденсора; тубусодержателя; тубуса; револьвера, в который ввинчиваются объективы; макровинта, который передвигает тубус вверх и вниз; микровинта.

2. Оптическая часть содержит объективы, призму, окуляры, осветительное устройство: зеркало, или осветитель (электрическая подсветка), конденсор, диафрагму.

Зеркало служит для направления световых лучей от объекта (микроба) к объективу. Плоская сторона – при искусственном освещении, вогнутая – при дневном.

Конденсор служит для собирания лучей, идущих от зеркала к одной точке – фокусу. Состоит из систем линз. Для яркого освещения при изучении неокрашенных объектов его поднимают вверх, для уменьшения освещенности опускают вниз.

Диафрагма находится под конденсором и состоит из металлических пластинок, которые рычажком раздвигаются и сдвигаются для увеличения или уменьшения доступа света. При сужении пластин световых лучей в объектив попадает мало, при открытии – больше.

Разрешающая способность для современных микроскопов находится в пределах 0,2 мкм и зависит от длины световой волны. Общее увеличение микроскопа – произведение увеличений объектива и окуляра. Максимальное увеличение микроскопа МБР-1350: $8 \cdot 90 = 720$; $10 \cdot 90 = 900$; $15 \cdot 90 = 1350$.

Окуляры по своему назначению сравниваются с лупой и увеличивают изображение объектива от 7 до 15 раз. Микроскопы бывают монокулярные (дают плоское изображение) и бинокулярные (изображение объемное, стереоскопическое).

Объективы бывают сухие и иммерсионные. Сухие объективы дают слабое увеличение (в 8–20 раз) из-за большого фокусного расстояния – пространства между фронтальной линзой сухого объектива и препаратом. Иммерсионные объективы позволяют получить увеличение в 40–90 раз из-за наименьшего фокусного расстояния между фронтальной линзой и препаратом. При иммерсионном микроскопировании на препарат наносят каплю иммерсионной жидкости (глицерин, вазелин или другие прозрачные масла – кедровое масло с показателем преломления 1,52, т. е. близким к показателю преломления стекла). При нанесении капли иммерсионного масла не происходит рассеивания лучей

света, а значит, хорошо освещается поле зрения. При использовании сухих объективов имеется прослойка воздуха. Световые лучи, проходящие через предметное стекло препарата, попадают в воздушную прослойку, преломляются, отклоняются и не полностью попадают в объектив. Освещенность поля зрения при этом будет незначительная.

Начало работы:

1. Установить микроскоп на малое увеличение ($\times 8$).
2. Навести максимальную освещенность:
 - а) поворотом зеркала;
 - б) максимальным поднятием вверх конденсора;
 - в) максимальным открытием диафрагмы.
3. Установить микропрепарат на предметный столик и закрепить его зажимами.
4. Найти изображение предмета под $\times 8$.
5. Нанести каплю иммерсионного масла на препарат.
6. Установить микроскоп на большое увеличение ($\times 90$) до щелчка.
7. Под контролем глаза макровинтом опустить объектив микроскопа максимально вниз, пока он не коснется иммерсионного масла.
8. Наблюдая в окуляр, поднимать макровинтом вверх тубус до тех пор, пока не появится изображение предмета.
9. Макровинтом установить более четкое изображение предмета.
10. Провести микроскопию мазка. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Окончание работы:

1. Поднять вверх тубус макровинтом.
2. Снять микропрепарат.
3. Объектив $\times 90$ отвести в сторону и салфеткой удалить остатки иммерсионного масла.
4. Установить микроскоп в нейтральное положение или на малое увеличение $\times 8$ и опустить тубус вниз.
5. Предметный столик покрыть марлевой салфеткой.
6. Поставить микроскоп в шкаф двумя руками: одной рукой берут за штатив, второй поддерживают за основание.

Особенностью этого микроскопа является наличие конденсора темного поля (парабо-

лоид-конденсора), который концентрирует световой пучок и направляет его на исследуемый объект сбоку. Ввиду того, что прямые лучи отсекаются центральной диафрагмой конденсора, а косые лучи, выходящие по периферии диафрагмы, не попадают в объектив, ультрамикроскоп имеет темное поле зрения. При освещении косыми лучами живых и неживых частиц, в том числе микробов, часть отраженных лучей попадает в объектив; при этом наблюдается яркое свечение частиц на темном фоне. Темнопольную микроскопию используют для изучения подвижности микробов, наблюдения очень тонких объектов (спирокет) в препарате «раздавленная капля».

Эта разновидность светового микроскопа позволяет изучать структуру живых неокрашенных микробов (прозрачных объектов). При прохождении света через неокрашенные микробные клетки, в отличие от окрашенных, амплитуда световых волн не меняется, а происходит лишь их изменение по фазе, что не улавливается глазом человека. Сдвиг по фазе происходит при прохождении участков с большей оптической плотностью (рибосомы, нуклеоид). Специальные приспособления: фазовый конденсор и объективы с фазовыми кольцами – позволяют преобразовать невидимые фазовые изменения в видимые амплитудные.

Принцип работы этого микроскопа основан на явлении люминесценции. Для получения изображения объектов их обрабатывают флюорохромами, которые при возбуждающем облучении коротковолновой частью спектра светятся цветами с большей длиной волны (зеленым, оранжевым и др.). В люминесцентном микроскопе изучают как живые, так и убитые микробы (с «сухой» или иммерсионной системами). Люминесцентная микроскопия позволяет получить контрастное цветное изображение, обнаружить малое количество микробов, изучить их структуру и химический состав, использовать метод иммунофлюоресценции.

Этот прибор отличается от световых микроскопов значительно большей разрешающей способностью (около 0,001 мкм) за счет использования вместо света пучка электронов, а вместо стеклянных оптических – электромагнитных линз (рис. 3). В электронном микроскопе изучают вирусы, ультраструктуру убитых микроорганизмов.



Рис. 3. JEM-2100 – просвечивающий электронный микроскоп высокого разрешения с превосходной управляемостью и возможностью масштабирования

1. Роль микробиологии как науки: предмет, методы, задачи.
2. Роль иммунологии как науки: предмет, методы, задачи.
3. Опишите начальный период развития микробиологии (А. Левенгук и др.).
4. Работы Л. Пастера и Р. Коха. Их значение в становлении и развитии микробиологии.
5. Назовите разделы микробиологии.
6. Назовите основные направления современной микробиологии.
7. Основные правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории.

8. Микробиологическая лаборатория: основные помещения, оборудование.

9. Устройство светового микроскопа и правила работы с иммерсионной системой. Понятие о разрешающей способности, общем увеличении микроскопа.

10. Микробиологические методы исследований и их сущность.

11. Кем сконструирован первый в мире микроскоп и впервые визуально замечены микроорганизмы?

12. Правила и принцип работы с иммерсионной системой микроскопа.

13. Особенности фазово-контрастной и темнопольной микроскопии.

14. Основные характеристики электронного микроскопа (разрешающая способность, общее увеличение). Особенности люминесцентной микроскопии.

15. Для чего используют паровые и сухожаровые стерилизаторы?

отработать технику приготовления и окраски простым методом мазков, приготовленных из микробных культур; провести микроскопию и зарисовать окрашенные в мазках микроорганизмы; изучить морфологические особенности микроорганизмов различных групп.

пробирки с культурами, выращенными на жидкой и плотной питательной средах; набор красок и реактивов для окрашивания мазков; пинцеты анатомические, стерильные ватные тампоны на спичке; микроскопы; таблицы с рисунками микроорганизмов, микрофлоры полости рта, строения бактериальной клетки; оборудованное рабочее место для бактериологического исследования, укомплектованное всем необходимым.

Мир микробов включает любой организм микроскопических размеров, поэтому термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Микроорганизмы встречаются в самых разных таксономиче-

ских группах, причем другие члены этой группы могут быть и макроорганизмами (например, водоросли и грибы).

– самая обширная по количеству представителей группа, и ее члены распространены повсеместно. У микроорганизмов встречаются все известные типы обмена веществ. Именно микроорганизмы были первыми живыми существами на нашей планете, которые и сформировали ее облик.

Микроорганизмы – наиболее древняя форма организации жизни на Земле. По количеству они представляют собой самую значительную и самую разнообразную часть организмов, населяющих биосферу.

К микроорганизмам относят:

- 1) бактерии;
- 2) вирусы;
- 3) грибы;
- 4) простейшие;
- 5) микроводоросли.

Общим признаком микроорганизмов являются их микроскопические размеры; отличаются они строением, происхождением, физиологией.

– одноклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишенные хлорофилла и не имеющие ядра.

– одноклеточные и многоклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишенные хлорофилла, но имеющие черты животной клетки, эукариоты.

– это уникальные микроорганизмы, не имеющие клеточной структурной организации.

– микроорганизмы, состоящие из одной клетки. В отличие от бактерий и вирусов, у простейших есть одно или несколько ядер.

– виды одноклеточных водорослевых организмов.

1. Изучить строение бактериальной клетки.
2. Изучить морфологические особенности микроорганизмов.
3. Приготовить мазки из бактериальных культур. Окрасить простым методом, зарисовать бактерии.

Общая схема строения бактериальной клетки показана на рис. 4.

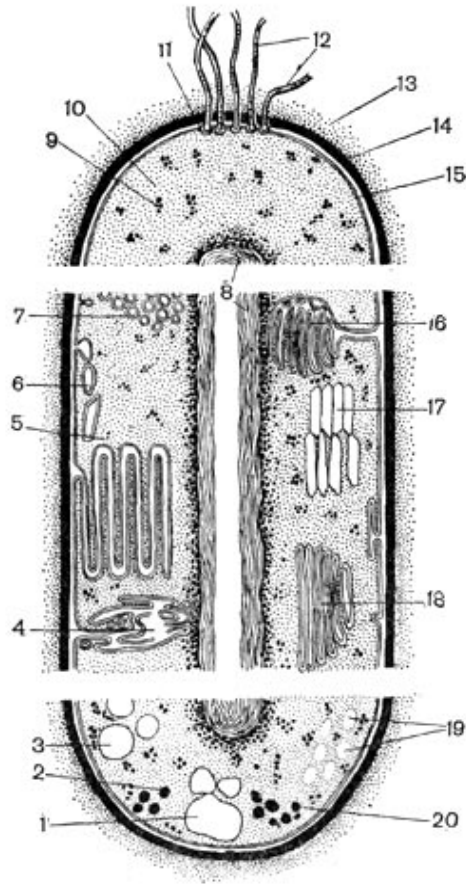


Рис. 4. Схематическое изображение строения бактериальной клетки (по Г. Шлегелю):

- 1 – гранулы поли-В-оксималяной кислоты; 2 – жировые капельки;
- 3 – включения серы; 4 – трубчатые тилакоиды; 5 – пластинчатые тилакоиды;
- 6 – пузырьки; 7 – хромофоры; 8 – ядро (нуклеоид); 9 – рибосомы;
- 10 – цитоплазма; 11 – базальное тельце; 12 – жгутики; 13 – капсула;
- 14 – клеточная стенка; 15 – цитоплазматическая мембрана; 16 – мезосома;
- 17 – газовые вакуоли; 18 – ламеллярные структуры; 19 – гранулы полисахарида;
- 20 – гранулы полифосфата (Основные структуры бактериальной клетки представлены в верхней части рисунка, дополнительные, мембранные структуры, имеющиеся у фототрофных и нефототрофных бактерий, – в средней части, а включения запасных веществ – в нижней части.)

Обязательными органоидами являются: ядерный аппарат, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана. *Необязательными (второстепенными) структурными элементами* являются: клеточная стенка, капсула, споры, пили, жгутики.

В центре бактериальной клетки находится – ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.

– сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидная ДНК), мезосомы (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

(ЦПМ) ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций: барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы – дыхательные, окислительно-восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других, не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего, обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий. В составе клеточной стенки – два основных слоя, из которых наружный более пластичный, внутренний – ригидный.

Основное химическое соединение клеточной стенки, которое специфично только для бактерий, – *пептидогликан* (муреиновые кислоты). От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий – *отношение к окраске по Граму*. В соответствии с ним выделяют две большие группы – грамположительные («грам⁺») и грамотрицательные («грам⁻») бактерии. Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с *генциановым фиолетовым* (окрашены в сине-фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет за счет докрасивания фуксином.

Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий.

Мощная, толстая, несложно организованная клеточная стенка, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, отсутствуют липополисахариды (ЛПС), часто – диаминопимелиновые кислоты.

Особенности клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, содержит ЛПС, липопротеины, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно – имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная.

При обработке грамположительных бактерий ферментами, разрушающими пептидогликан, возникают полностью лишенные клеточной стенки структуры – . Обработка грамотрицательных бактерий лизоцимом разрушает только слой пептидогликана, не разрушая полностью внешней мембраны; такие структуры называют

. Протопласты и сферопласты имеют сферическую форму (это свойство связано с осмотическим давлением и характерно для всех бесклеточных форм бактерий).

. Протопласты и сферопласты имеют сферическую форму (это свойство связано с осмотическим давлением и характерно для всех бесклеточных форм бактерий).

L-формы бактерий. Под действием ряда факторов, неблагоприятно действующих на бактериальную клетку (антибиотики, ферменты, антитела и др.), происходит *L-трансформация* бактерий, приводящая к постоянной или временной утрате клеточной стенки. L-трансформация является формой не только изменчивости, но и приспособления бактерий к неблагоприятным условиям существования. В результате изменения антигенных свойств (утрата O- и K-антигенов), снижения вирулентности и других факторов L-формы приобретают способность длительно находиться (*персистировать*) в организме хозяина, поддерживая вяло текущий инфекционный процесс. Утрата клеточной стенки делает L-формы нечувствительными к антибиотикам, антителам и различным химиопрепаратам, точкой приложения которых является бактериальная клеточная стенка.

Нестабильные L-формы способны *реверсировать* в классические (исходные) формы бактерий, имеющих клеточную стенку. Имеются также стабильные L-формы бактерий, отсутствие клеточной стенки и неспособность реверсировать которых в классические формы бактерий закреплены генетически. Они по ряду признаков очень напоминают микоплазмы и другие *молликуты* – бактерии, у которых клеточная стенка отсутствует как таксономический признак. Микроорганизмы, относящиеся к микоплазмам, – самые мелкие прокариоты, не имеют

клеточной стенки и, как все бактериальные бесстеночные структуры, имеют сферическую форму.

К поверхностным структурам бактерий (необязательным, как и клеточная стенка) относятся *капсула, жгутики, микроворсинки*.

Капсула, или слизистый слой, окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют *микрокапсулу*, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, и *макрокапсулу*, обнаруживаемую при световой микроскопии. Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов – фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций – распознавание и поглощение.

У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов – чаще в организме хозяина. Существует ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава. Капсула чаще состоит из полисахаридов (наиболее распространенная окраска – *по Гинсу*), реже – из полипептидов.

Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (*флагеллиновых* по химическому составу) образований – жгутиков.

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.

1. Монотрихи – имеют один полярный жгутик.
2. Лофотрихи – имеют полярно расположенный пучок жгутиков.
3. Амфитрихи – имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.
4. Перитрихи – имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у бактерий генетически детерминирована.

Фимбрии, или *реснички*, – короткие нити, в большом количестве окружающие бактериальную клетку, с помощью которых бактерии прикрепляются к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек). Таким образом, фимбрии являются *факторами адгезии и колонизации*.

F-пили (фактор фертильности) – аппарат *конъюгации бактерий*. F-пили встречаются в небольшом количестве в виде тонких белковых ворсинок.

Эндоспоры и спорообразование. Спорообразование – способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. *Эндоспоры* образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью (*резистентностью*) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных факторов окружающей среды. При световой микроскопии часто используют метод выявления спор *по Ожеешко*. Высокая резистентность связана с большим содержанием *кальциевой соли дитиолиновой кислоты* в оболочке спор. Расположение и размеры спор у различных микроорганизмов отличаются, что имеет дифференциально-диагностическое (таксономическое) значение. Основные фазы «жизненного цикла» спор – *споруляция* (включает подготовительную стадию, стадию предспоры, образования оболочки, созревания и покоя) и *прорастание*, заканчивающееся образованием вегетативной формы. Процесс спорообразования генетически обусловлен.

Некультивируемые формы бактерий. У многих видов грамотрицательных бактерий, не образующих спор, существует особое приспособительное состояние – некультивируемые формы. Они обладают низкой метаболической активностью и активно не размножаются, т. е. не образуют колоний на плотных питательных средах, при посевах не выявляются. Обладают высокой устойчивостью и могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких лет. Не выявляются классическими бактериологическими методами, обнаруживаются только с помощью генетических методов (*полимеразной цепной реакции – ПЦР*).

Разнообразие форм бактериальных клеток невелико. Основные формы бактерий – это шары (кокки), палочки (прямые, изогнутые или извитые), тороиды и звезды (рис. 5).

По морфологии микроорганизмы бывают шаровидные, палочковидные и извитые.

Бактерии шаровидные – кокки (от греч. *coccus* – зерно, шарик). Они делятся на следующие группы:

– микрококки – в природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток. В качестве примера можно привести клетки *Micrococcus agilis* (от лат. *micro* – маленький, *agilis* – подвижный);

– диплококки (от лат. *diploos* – двойной) – шаровидные бактерии, расположенные попарно. Они образуются при делении кокков в одной плоскости;

– стафилококки – располагаются беспорядочно, скопления кокков чаще напоминают гроздь винограда (от греч. *staphyle* – виноградная гроздь);

– стрептококки – образуются делением кокков в одной плоскости, клетки располагаются цепочкой. С этими бактериями знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Streptococcus lactis*. Родовое название отражает характер расположения шаровидных клеток в виде цепочки, видовое – причастность стрептококка к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* – молочный);

– тетракокки – кокки, расположенные по четыре клетки (от греч. *tetra* – четыре). Такое расположение клеток – результат деления материнских форм в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

– сарцины – по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются вследствие деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (от лат. *sarseo* – соединяю). Удобна для просмотра *Sarcina flava* (сарцина желтая) – наиболее обычный представитель микрофлоры воздуха.

Все вышеуказанные формы бактерий грамположительные, за редким исключением неподвижные. Диаметральный размер их – 0,7–0,8 мкм.

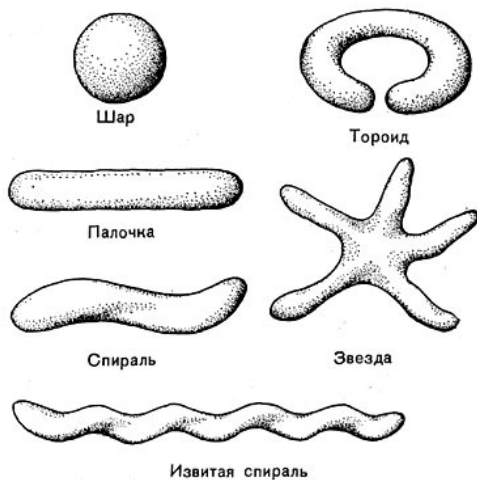


Рис. 5. Основные формы бактериальных клеток

К палочковидным бактериям относят бактерии и бациллы. Бактерии спор не образуют, а бациллы образуют споры. Истинные палочковидные бактерии имеют длину до 4 мкм. Бациллы могут иметь длину до 20 мкм и более, несколько толще истинных бактерий. Они размножаются поперечным делением, реже поперечным.

К *извитым бактериям* относят вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы имеют цилиндрическую изогнутую форму, напоминающую запятую.

Спириллы – бактерии, имеющие форму спирально изогнутых палочек с 4–6 крупными завитками.

Спирохеты – прокариоты спирально извитой формы, имеющие более 6 мелких завитков.

На рис. 6 показаны морфологические формы различных микроорганизмов.

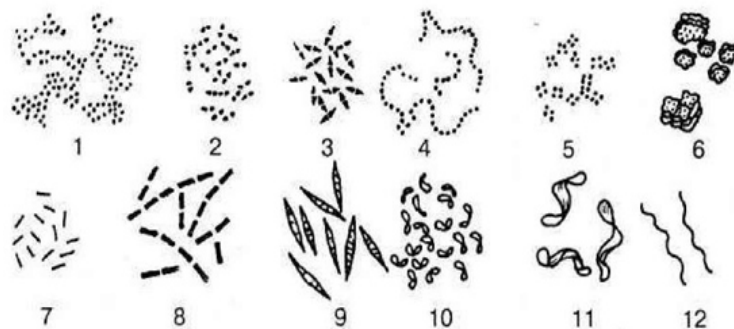


Рис. 6. Основные формы бактерий: 1 – стафилококки; 2, 3 – диплококки; 4 – стрептококки; 5 – тетракокки; 6 – сарцины; 7, 8 – палочки, не образующие спор; 9 – палочки, образующие споры; 10 – вибрионы; 11 – спириллы; 12 – спирохеты

1. Ознакомиться с сущностью и этапами микроскопического метода диагностики. Определение, этапы микроскопического метода записать в тетрадь.

2. Ознакомиться с характеристикой простых методов окрашивания.

3. Стерильным ватным тампоном на спичке снять зубной налет и остатки пищи между зубами, нанести на предметное стекло путем прикладывания (кляч-препарат), высушить, зафиксировать и окрасить генциановым фиолетовым (по Синеву).

4. Приготовить препараты-мазки из культуры антропоида, высушить, зафиксировать, окрасить метиленовым голубым (по Леффлеру).

5. Приготовить мазки по Бурри: в каплю туши на стекле внести поочередно культуру кишечной палочки и антракоида. Затем размазать покровным стеклом, высушить.

На препараты нанести иммерсионное масло, промикроскопировать и зарисовать в тетради.

– это метод обнаружения и определения микроорганизмов в исследуемом материале на основании:

- морфологии микробной клетки;
- специфического расположения микробных клеток в мазке;
- наличия специфических (необязательных) органоидов в микробной клетке;
- тинкториальных свойств микробной клетки (отношение к красителям).

1-й этап – приготовление препарата:

- приготовление мазка;
- высушивание мазка;
- фиксация мазка.

2-й этап – окрашивание препарата: в зависимости от цели исследования мазок окрашивается разными методами:

- простые (определение формы микроорганизмов, расположения их в мазке) (рис. 7, 8);
- сложные (выявление отдельных клеточных структур).

3-й этап – микроскопия препарата.

4-й этап – заключение по результатам исследования.

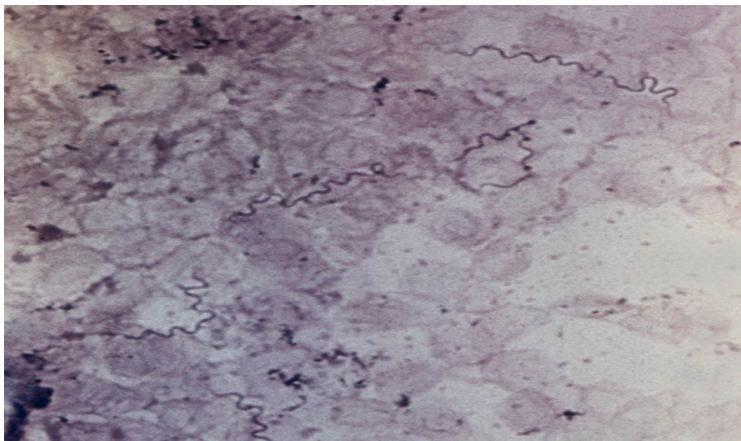


Рис. 7. Окраска бактерий простым методом: спирохеты (*Borellia sp.*) в патологическом материале, окраска генцианвиолетом



Рис. 8. Окраска бактерий простым методом: культура возбудителя ботулизма (*Clostridium botulinum*), окраска фуксином Циля

Для окраски препаратов в бактериологической практике используются как основные, так и кислые красители.

Из основных красителей наиболее часто применяются: нейтральный – сафранин, фуксин (красные); генцианвиолет, метилвиолет, кристаллвиолет (фиолетовые); везувин (коричневый); метиленовый синий, малахитовый зеленый.

Из кислых красителей широкое применение находят: кислый фуксин, эозин (красные), Конго, пикриновая кислота (желтые); нигрозин (черный). Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, предложенной А. И. Синевым.

Различают простые и сложные методы окраски. При простом методе прокрашивается вся клетка, при сложном – определенные клеточные структуры. Простой метод окраски позволяет быстро определить форму микроорганизмов, размеры, расположение микроорганизмов в мазке. Для этого применяют один краситель. Чаще всего пользуются фуксином или метиленовым синим.

Особенности методов: одноэтапность, окраска одним красителем.

Назначение методов: изучение формы, взаимного расположения микробов в мазке, размеров клетки.

При приготовлении мазка с плотной питательной среды на обезжиренное предметное стекло наносят петлей небольшую каплю физиологического раствора. В правую руку берут бактериологическую петлю, в левую – пробирку с культурой. Петлю стерилизуют, внося ее в пламя горелки в вертикальном положении.

После того как петля накалится докрасна, через пламя горелки проводят конец петледержателя. Затем вынимают пробку из пробирки, захватив ее мизинцем правой руки или зажав между мизинцем и безымянным пальцами, и обжигают на спиртовке край пробирки. Петлю вносят в пробирку, охлаждают ее, прикасаясь к стенкам, после чего с поверхности среды снимают небольшое количество культуры. После этого петлю вынимают, не касаясь стенок пробирки, обжигают края пробирки над спиртовкой и закрывают пробкой.

Захваченную микробную культуру вносят в каплю физиологического раствора, нанесенную ранее на предметное стекло, тщательно размешивают и равномерно распределяют по стеклу в виде овала, круга или квадрата площадью 1–1,5 см², отступив от краев стекла не менее 3–5 мм. По окончании приготовления мазка петлю вновь стерилизуют, после высушивания границы мазка обводят восковым карандашом с обратной стороны стекла и записывают шифр препарата.

При изготовлении мазка из культур с жидких питательных сред на предметное стекло наносят 1–3 петли исследуемого материала и равномерно распределяют по нему; при этом использование физиологического раствора не требуется. Далее поступают так же, как описано выше. Для приготовления препаратов используют бактериологические петли и пастеровские пипетки.

Высушивание мазка производят на воздухе, над пламенем горелки (но не в пламени), в потоке теплого воздуха и в термостате.

Различают *физический* и *химический* методы.

При фиксации физическим методом стекло с мазком, обращенным кверху, медленно проводят 3–4 раза через пламя. При этом микроорганизмы погибают, мазок прикрепляется к стеклу и не смывается.

Фиксация химическим методом достигается погружением мазков в фиксирующую жидкость, которой может служить спирт, спирт-эфир в равных частях, охлажденный ацетон, спирт-формалин и др.

Продолжительность фиксации спиртом-ректификатом составляет 15–20 мин, спирт-эфиром (в равных частях) – 10–15, метиловым спиртом – 5 мин, хлороформом – несколько секунд, ацетоном – 5 мин.

На приготовленный и фиксированный мазок, помещенный на специально предназначенный для этих целей мостик, который расположен над ванночкой и состоит из двух стеклянных палочек, находящихся на расстоянии $\frac{2}{3}$ длины предметного стекла друг от друга и скрепленных между собой резиновыми трубочками, наносят какой-либо краситель: растворы метиленового голубого – на 3–5 мин, генцианового фиолетового – на 2–3 мин, фуксина основного – на 2–3 мин. Затем тщательно и быстро промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, наносят каплю иммерсионного масла, микроскопируют. Мазок считается качественным, если бактерии расположены изолированно друг от друга и равномерно окрашены.

Приготовленные препараты микроскопируют в иммерсионной системе. Определяют морфологию микроорганизмов. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

1. Строение бактериальной клетки. Обязательные и необязательные компоненты бактериальной клетки.

2. Кислотоустойчивые бактерии. Особенности химического состава. Диагностическое значение.

3. Постоянные структурные компоненты бактериальной клетки (нуклеоид, мезосомы, рибосомы, ЦПМ).

4. Споры бактерий: функции, значение, химический состав. Этапы спорообразования. Этапы прорастания спор.

5. Капсула бактерий: химический состав, функции, роль капсулообразования в патогенезе инфекционных заболеваний.

6. Плазмиды и другие внехромосомные факторы наследственности. Строение, функции, роль в детерминации патогенных признаков и лекарственной устойчивости.

7. Жгутики бактерий. Строение и их значение для бактериальной клетки. Классификация микроорганизмов по расположению и числу жгутиков.

8. Особенности морфологии и структура шаровидных бактерий (тип дыхания, питательные среды для культивирования в лаборатории, распространение в природе, роль в патологии животных и человека).

9. Особенности морфологии и структуры палочковидных неспорообразующих бактерий (тип дыхания, питательные среды для культивирования в лаборатории, распространение в природе, роль в патологии животных и человека).

10. Методы стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и т. д. (характеристика методов, их режим, объекты стерилизации).
11. Сущность и этапы микроскопического метода диагностики.
12. Основные краски, предназначенные для окрашивания мазков. Техника приготовления фиксированного мазка.
13. Простой метод окраски микроорганизмов.
14. Методы лабораторных исследований и их сущность.
15. Укажите, какие имеются формы микробов?

изучить сущность и назначение сложных методов окраски микробов по методам Циля – Нильсена, Ожешко, Бурри – Гинса, Леффлера и Нейссера; освоить технику окраски по методу Грама.

рабочее место для бактериологического исследования, укомплектованное всем необходимым; таблицы с рисунками поэтапного окрашивания микробов по Граму, с указанием последовательности и продолжительности окраски мазков растворами красок; пробирки с дрожжевыми культурами; стаканчики с прокисшим пивом.

Сложные методы окрашивания имеют важное значение при определении и дифференциации различных видов микробов. При этом мазок подвергается воздействию двух красок, из которых одна – основная, а вторая – дополнительная. Кроме красящих веществ при сложных методах окрашивания применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и др.

Сложные методы позволяют кроме морфологии (форм, размера, взаимного расположения микроорганизмов) более детально изучить структуру и различные элементы микробной клетки (споры, капсулы, жгутики, наличие или отсутствие зернистости, биполярности и т. д.); определить тинкториальные свойства (различное окрашивание при использовании специальных методов). Сложные методы окрашивания основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки.

Среди микроорганизмов есть такие, которые обладают выраженной устойчивостью к неорганическим кислотам, спиртам, щелочам. Их называют кислотоустойчивыми микроорганизмами. Эта особенность связана с наличием в клеточной стенке и цитоплазме сравнительно большого количества липидов, воска, миколовой кислоты. Из патогенных микроорганизмов кислотоустойчивостью обладают возбудители туберкулеза, лепры, некоторые виды актиномицет.

Отношение микробов к окрашиванию по Граму является важным дифференциальным признаком, который в сочетании с другими позволяет отличить один микроб от другого. Метод был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. При окрашивании по этому методу все микроорганизмы подразделяются на грамположительные и грамотрицательные, что зависит от химического состава и строения клеточной стенки. Толщина клеточной стенки грамположительных микроорганизмов находится в пределах 20–60 нм, плотно прилегает к цитоплазме, мембране и состоит на 40–90 % из пептидогликана, или муреина, – опорного полимера, имеющего сетчатую структуру. Клеточная стенка грамположительных бактерий в 3 раза тоньше (10–20 нм), многослойна, содержит до 5–10 % пептидогликана.

Особенностью окрашивания по методу Грама является неодинаковое отношение различных микробов к красителям трифенилметановой группы: генцианвиолету, метилвиолету, кристаллвиолету. Микробы, входящие в группу грамположительных, дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. Окрашенные микробы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при продолжительной окраске фуксином грамположительные микробы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Грамположительные микроорганизмы образуют с этими красителями и йодом непрочное, легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Это объясняется тем, что проницаемость клеточной стенки у грамположительных бактерий меньше, чем у грамотрицательных, из-за большого содержания пептидогликана и меньшего диаметра пор, что способствует удержанию образующегося комплекса при обработке бактерий этанолом, у грамотрицательных бактерий – наоборот (рис. 9–12).

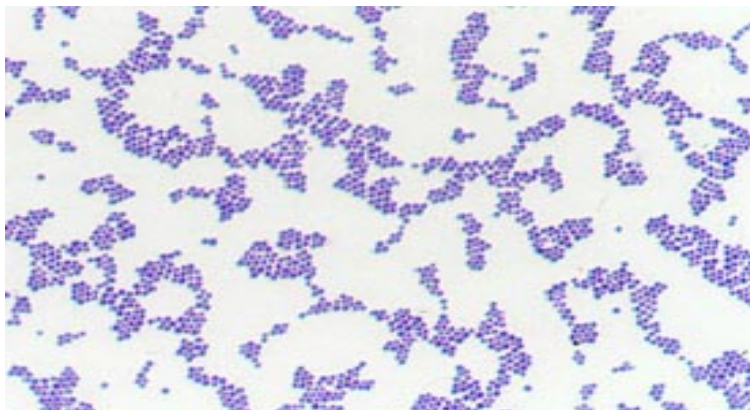


Рис. 9. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) – грамположительен

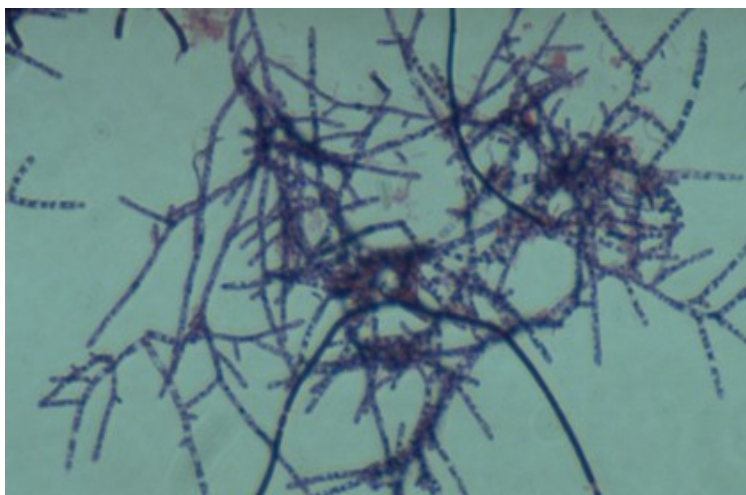


Рис. 10. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): актиномицет (*Actinomyces*) – грамположительен

Таким образом, при содержании в мазке бактерий различных видов можно обнаружить как грамположительные (фиолетового цвета), так и грамотрицательные (розово-красного цвета) бактерии.

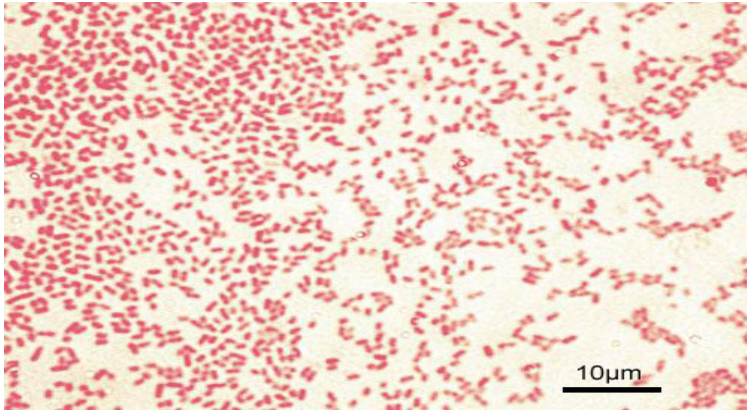


Рис. 11. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательна

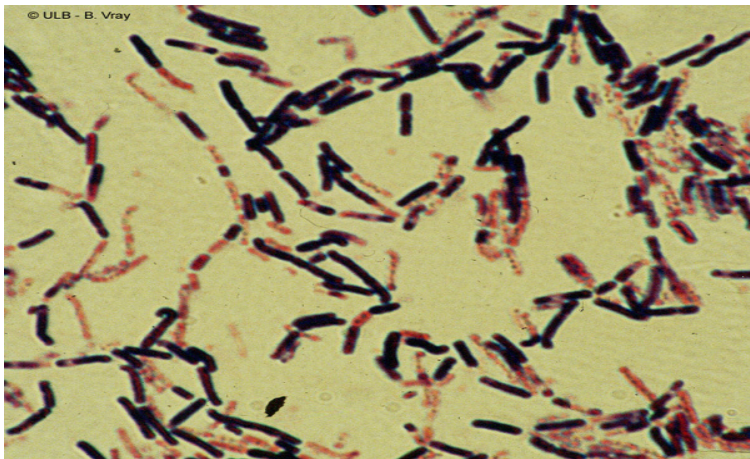


Рис. 12. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): *Clostridium perfringens* – молодые микробные клетки грамположительны, старые микробные клетки грамотрицательны

1. Ознакомиться с характеристикой сложных методов окрашивания. Изучить сущность и назначение сложных методов окраски.

2. Изучить сущность окраски по методам Циля – Нильсена, Ожешко, Бурри – Гинса, Леффлера и Нейссера.

3. Приготовить мазки из отдельных культур бактерий и окрасить по Граму.

4. Окрашенные препараты микроскопировать. Изучить морфологию и зарисовать.

Сложные методы окраски (их еще называют дифференциальными) основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для изучения структуры клетки, а также для дифференциации микроорганизмов на основе их тинкториальных свойств.

При сложном способе окраски на мазок, приготовленный из исследуемого материала, воздействуют двумя красящими веществами, из которых одно вещество является основным, а другое – дополнительным. Кроме красящих веществ, при сложных методах окраски применяют различные дополнительные вещества: спирт, кислоты, щелочи – для обесцвечивания или протравы микроорганизмов.

Особенности методов: многоэтапность; окраска двумя красителями; протравители, дифференцирующие вещества.

Назначение методов:

- дифференцирование одних видов микробов от других: метод Грама, метод Циля – Нильсена, метод Романовского – Гимзы;

- изучение структуры микробной клетки: метод Ожешко (споры), метод Бурри – Гинса (капсула), методы Леффлера и Нейссера (включения), метод Леффлера (жгутики).

Основным способом выявления кислотоустойчивых микроорганизмов является *окраска по методу Циля – Нильсена*. Именно этот способ применяют для обнаружения микобактерий туберкулеза в мокроте больных людей.

для окрашивания кислотоустойчивых бактерий вместо обычных красителей применяют концентрированные растворы красителей с подогревом, например, карболовый фуксин Циля, который окрашивает все микроорганизмы в рубиново-красный цвет. При последующей кратковременной обработке кислотой одни микробные клетки прочно удерживают краситель и не обесцвечиваются в растворе кислот, другие – теряют цвет. Это позволяет

кислотоустойчивые микроорганизмы отличить от микроорганизмов, не обладающих этим свойством. Затем при дальнейшем докрасивании красителем другого цвета (например, метиленовой синью) неокислотоустойчивые микроорганизмы приобретают цвет дополнительного красителя (рис. 13). А кислотоустойчивые микроорганизмы сохраняют цвет основного красителя (фуксина Циля).

В препарате, окрашенном по методу Циля – Нильсена, кислотоустойчивые микроорганизмы имеют рубиново-красный цвет, неокислотоустойчивые микроорганизмы, лейкоциты, элементы ткани – голубой цвет.

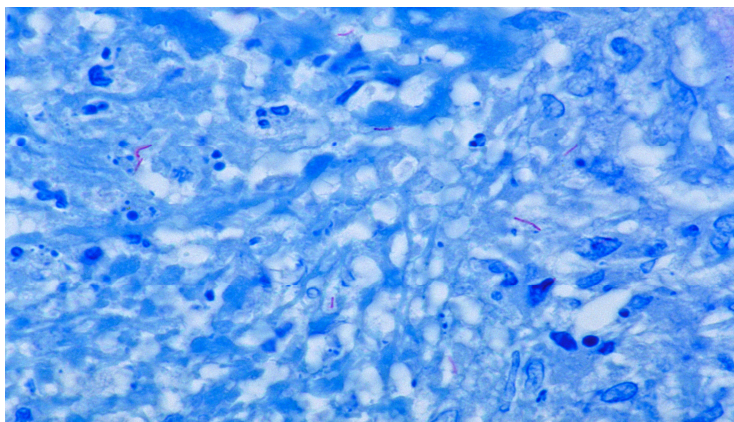


Рис. 13. Окраска кислото-щелоче-спиртоустойчивых микроорганизмов по Цилю – Нильсену: возбудитель туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) окрашивается в красный цвет, фон препарата – голубой

Наличие спор у микроорганизмов можно обнаружить с помощью **окраски по методу Ожешко**.

споры по сравнению с вегетативной клеткой обладают устойчивостью к факторам окружающей среды. Они являются кислотоустойчивыми и с трудом воспринимают красители. Объясняется это наличием плотной оболочки, небольшой концентрацией свободной воды, высоким содержанием липидов. В препаратах, окрашенных простым способом или по Граму, споры остаются бесцветными. Поэтому для окраски спор пользуются специальными методами с применением протравителей (кислоты, щелочи). Протравители разрыхляют оболочку споры, облегчая проникновение в нее красителя. Далее действуют по такому же принципу, как для окраски кислото-

устойчивых микроорганизмов: препарат окрашивают концентрированным красителем (например, карболовым фуксином Циля) с подогревом, а затем обесцвечивают кислотой и докрашивают в какой-нибудь контрастный цвет (например, метиленовым синим).

По методу Ожешко споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в голубой.

Наличие капсулы у микроорганизмов можно определить, **окрасив препарат по методу Бурри – Гинса.**

в силу своего химического строения капсулы при обычных методах окраски остаются бесцветными. Для их обнаружения применяют негативную окраску. Все представленные ранее методы относятся к позитивным, так как при их использовании окрашиваются микробные клетки. При негативных же способах краситель заполняет пространство вокруг бактерий (для этого можно использовать черную плакатную тушь, которая не проникает в микробную клетку, а следовательно, не окрашивает ее). Далее докрашивается красителем (например, фуксином) микробное тело. В результате капсула будет контрастировать на темном фоне препарата и микробной клетки.

При окрашивании по методу Бурри – Гинса на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

В цитоплазме некоторых бактерий могут образовываться отложения гранул (зерен) волютина, гликогена, гранулезы, капелек жира, кристаллов оксалатов, жидкой серы, скоплений пигмента. Зерна волютина содержат значительное количество метафосфатов и других соединений фосфора. Эти зерна хорошо обнаруживаются, например, у дифтерийной палочки, что является важным дифференциально-диагностическим признаком возбудителя дифтерии. Для обнаружения зерен волютина чаще всего пользуются **методами окраски по Леффлеру и Нейссеру.**

зерна волютина по своему составу отличаются от цитоплазмы. При простой окраске (например, щелочным метиленовым синим) зерна волютина выявляются в виде более темных участков цитоплазмы, т. е. гранулы окрашиваются более интенсивно, чем цитоплазма (явление метахромазии).

По методу Леффлера цитоплазма микробных клеток окрашивается в голубой цвет, гранулы волютина – в синий.

в силу того что зерна волютина отличаются от цитоплазмы по химическому составу, при сложной окраске они адсорбируют иные красители, чем цитоплазма, и поэтому окрашиваются в другой цвет.

По методу Нейссера тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютина – в темно-синий, почти черный.

1. Фиксированный на огне мазок окрашивают генциан-, метил- или кристаллвиолетом в течение 2 мин, положив на него бумажку, приготовленную по методу Синева. На ее поверхность наносят несколько капель (3–5) дистиллированной воды и выдерживают в течение 2 мин.

2. Бумажку снимают, краску сливают и на препарат наливают раствор Люголя на 2 мин.

3. Обрабатывают мазок спиртом-ректификатом в течение 20–30 с.

4. Быстро и тщательно промывают мазок водой.

5. Докрашивают фуксином Пфейффера в течение 2 мин.

6. Промывают водой, высушивают, микроскопируют.

грамположительные бактерии окрашиваются основной краской в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные, принимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

Грамположительно окрашиваются стафилококки, дрожжи, стрептококки, возбудитель сибирской язвы, почвенно-гнилостные споровые палочки (например, сенная, капустная, картофельная, корневидная и др.), возбудитель рожи свиней, клостридии, возбудитель туберкулеза и др.

Грамотрицательно окрашиваются все представители энтеробактерий (сальмонеллы, кишечная палочка, протей и др.), возбудители бруцеллеза, пастереллеза, некробактериоза, туляремии, синегнойная палочка, минингококки, уксуснокислые бактерии.

Споры окрашиваются сложным методом, поскольку они имеют плотную оболочку. Перед окрашиванием изменяют прозрачность оболочки спор путем воздействия на нее протравителями (хромовой, соляной кислотами) или раствором фенола при подогревании. Оболочка при этом размягчается, увеличивается порозность. Краситель хорошо адсорбируется, споры не обесцвечиваются при кратковременном воздействии кислотой. Вегетативные же тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и становятся видимыми только при дополнительном окрашивании контрастным красителем.

Техника окрашивания (метод Златогорова). Мазок фиксируют над пламенем горелки. На его поверхность кладут фильтровальную бумагу величиной с покровное стекло, окрашенную фуксином основным феноловым Циля. Бумагу смачивают 3–5 каплями воды. Окрашивание проводят при подогревании в течение 5–7 мин. Чтобы мазок не высы-

хал, во время испарения жидкости к нему (по каплям) добавляют воду. Затем мазок обесцвечивают 3%-ным раствором серной кислоты в течение 5–10 с и промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят метиленовым голубым до 2–3 мин, после чего мазок промывают водой и высушивают.

В поле зрения микроскопа видно, что споры окрашены в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий.

Окрашивание спор по Пеишкову. После фиксации над пламенем горелки или смесью (спирт + формалин) мазок окрашивают метиленовым голубым Леффлера (над пламенем горелки) в течение 15–20 с. Промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят 0,5%-ным раствором нейтрального красного в течение 30 с. Затем промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина: споры голубые или синие, молодые споры – черно-синие, вегетативные формы – розовые, включения (хроматиновые) – фиолетовые.

Некоторые микробы способны образовывать капсулу – слизистый слой оболочки, который синтезируется в цитоплазме и секретируется на поверхности клеточной стенки. Размеры их чаще превышают тело микробной клетки. Химический состав капсул различен: одни из них состоят из комплекса белков, другие – из полисахаридов. Капсула и остальная часть клетки окрашиваются неодинаково. Существует несколько методов окрашивания капсул (методы Ольга, Михина, Романовского – Гимзы, Бурри – Гинса) (рис. 14–16).



Рис. 14. Капсулы бактерий *Bacillus anthracis*, окраска по Романовскому – Гимзе

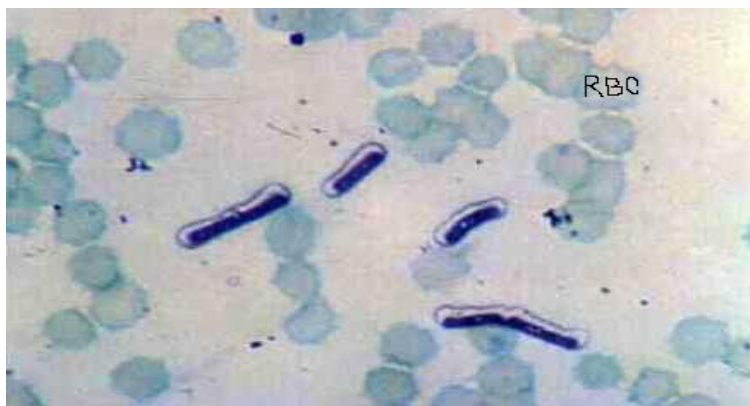


Рис. 15. Капсулы бактерий *Bacillus anthracis*, окраска по Михину

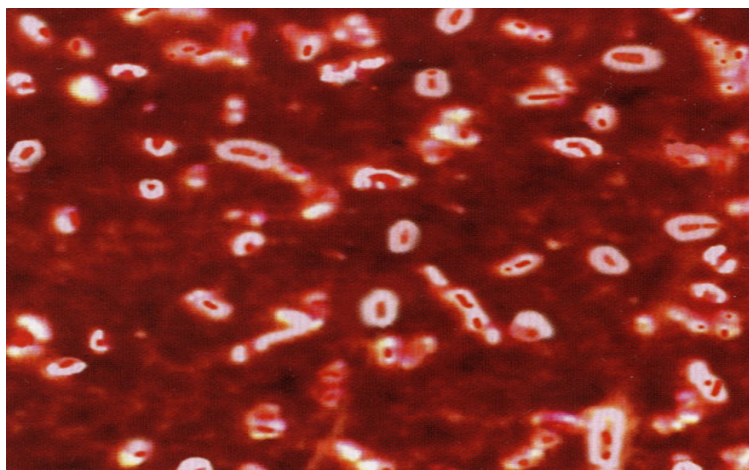


Рис. 16. Капсулы бактерий *Klebsiella pneumoniae*, окраска по Бурри – Гинсу

Метод Ольта. Мазок окрашивают 2–3%-ным раствором сафранина. Краситель готовят перед применением, растворяя его в горячей воде с последующим фильтрованием. Окрашивают при легком нагревании в течение 1–2 мин и быстро промывают водой.

Препарат не высушивают, на нем должна быть вода, накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой

микроскопа. Световые лучи, проходя через слой воды, усиливают разницу и преломление лучей от капсулы и тела микробной клетки.

В поле зрения микроскопа видно, что тела микробных клеток окрашены в красный цвет, капсулы – в желтый.

Метод Михина. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым голубым Леффлера (лучше старым раствором) в течение 2–3 мин при подогревании. Краситель быстро смывают водой, мазок высушивают.

Микроскопическая картина: тела микробных клеток темно-синие, капсулы светло-розовые.

Окрашивание гликогена. В цитоплазме микробных клеток часто встречается гликоген – животный крахмал (полисахарид). Его можно обнаружить путем добавления к капсуле культуры такого же количества раствора Люголя. При соединении с раствором Люголя гликоген приобретает красно-бурую окраску. Такое включение встречается у дрожжей, сенной бациллы и других микробов. Накопление гликогена происходит в том случае, когда в среде имеется достаточное количество углеводов.

Окрашивание гранулезы. Гранулеза – полисахарид, крахмалоподобное вещество. В большом количестве содержится в клетках перед спорообразованием. Как и гликоген, гранулеза реагирует на раствор Люголя, она окрашивается им в темно-синий цвет. Много гранулезы содержат маслянокислые бациллы. Для обнаружения гранулезы к капле культуры маслянокислых микробов, выращенных на картофельной среде, добавляют столько же раствора Люголя и накрывают прозрачным стеклом. Под иммерсионной системой микроскопа видны веретенообразные клетки, окрашенные в синий цвет. На одном из концов таких клеток расположены неокрашенные споры.

Окрашивание зерен волютина. Волютин в микробных клетках встречается в виде гранул, которые состоят из полифосфатов и веществ, близких к нуклеиновым кислотам. В них сосредоточены запасы фосфатов. Обнаружить гранулы волютина в микробной клетке можно при окрашивании препарата по Омелянскому.

Мазок, фиксированный над пламенем горелки, окрашивают в течение 30 с фуксином основным феноловым Циля. После промывания мазок обесцвечивают 1%-ным раствором серной кислоты в течение 20–30 с. Снова промывают водой и дополнительно окрашивают слабым раствором метиленового голубого (1:40) в течение 15–20 с.

Микроскопическая картина: гранулы волютина красные, цитоплазма синяя.

1. Каково назначение сложных методов окраски микроорганизмов?
2. На чем основаны сложные методы окраски?
3. Простые и сложные методы окраски, цели их применения.
4. Краски и красящие растворы, применяемые в микробиологической практике.
5. Объясните, как происходит окрашивание включений.
6. Каким методом окрашиваются споры? Опишите его.
7. Сущность окраски по методу Циля – Нильсена. Используемые ингредиенты, механизмы и этапы окраски.
8. Метод окраски по Ожешко, его сущность и практическое значение.
9. Сущность окраски по методу Бурри – Гинса, практическое значение.
10. Поясните метод окраски по методу Леффлера.
11. Опишите сущность окраски по методу Нейссера.
12. Сущность окраски по Граму. Дифференциально-диагностическое значение.
13. Какую роль выполняет раствор Люголя при окрашивании по методу Грама?
14. Какие дифференцирующие вещества используются при окраске по Граму?
15. На чем основан принцип широко используемых методов окраски капсул?

ознакомиться с рецептурой, техникой приготовления и стерилизации различных питательных сред для культивирования микробов, с методами стерилизации лабораторной посуды и инструментов.

колбы, пробирки; сухие питательные среды, набор готовых сред для микроорганизмов различных классов; автоклавы, сушильные шкафы, пипетки, бактериологические чашки (Петри), скальпели, пинцеты, стерилизаторы.

Микроорганизмы, за исключением облигатных внутриклеточных (хламидии, риккетсии), культивируют на питательных средах. Выращивание бактерий осуществляют, преследуя научно-исследовательские цели, т. е. получение определенного количества бактериальной массы и изучение химического состава бактерий, их физиологии, генетики и т. д. Постановка лабораторного диагноза при различных инфекционных заболеваниях диктует сугубо практическую необходимость выделения чистой культуры патогена и ее идентификации. Для этого нужны качественные питательные среды. Среда необходима также для поддержания и длительного хранения ценных производственных и музейных штаммов микроорганизмов, для санитарно-бактериологической оценки продуктов питания для людей, кормов для животных и т. д.

Производство вакцин, гипериммунных сывороток, иммуноглобулинов, анатоксинов, диагностических препаратов и т. д. не осуществимо без использования питательных сред. Питательные среды широко применяют в промышленной микробиологии, одной из главных задач которой является увеличение выхода целевого продукта. Выход продукта по отношению к использованной питательной среде называют экономическим коэффициентом. Чем выше экономический коэффициент, тем выше продуктивность биотехнологического процесса. При низкой продуктивности производство оказывается нерентабельным и неконкурентоспособным. Необходимо заметить, что любое микробиологическое исследование требует наличия питательных сред для культивирования бактерий. Питательная среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки, – источники углерода, азота, макро- и микроэлементы, ростовые вещества.

Мир микробов обширен и разнообразен. Конструктивные и энергетические возможности микроорганизмов также разнообразны. Индивидуальные потребности отдельных видов бактерий в питательных веществах различны. Поэтому универсальной питательной среды, пригодной для культивирования всех видов микроорганизмов, не существует.

Разнообразие метаболизма бактерий проявляется, прежде всего, в их отношении к источникам углерода и азота. Эти элементы представлены в средах различными веществами, и они в наибольшей степени определяют специфичность сред.

Основное внимание надо уделять источникам азота. Все искусственные питательные среды, изготавливаемые в лаборатории, в биологической промышленности, выпускаемые централизованно (сухие питательные среды), имеют в своей основе вещества, содержащие азот. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред, особенно в больших количествах (на биофабриках), служит мясо (преимущественно говяжье). Требования микроорганизмов к источнику азота неодинаковы. Для культивирования микробов, фиксирующих молекулярный азот, используют среды, не содержащие соединений азота. В состав других сред входят разнообразные азотсодержащие соединения: нитриты, соли аммония, одна или несколько аминокислот. Известны микроорганизмы, нуждающиеся в полном наборе аминокислот или белках.

Аутотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода углекислоту воздуха или карбонатов. Гетеротрофные микроорганизмы такими соединениями углерода не могут быть удовлетворены. Для развития гетеротрофных микробов в среде должны быть более восстановленные соединения углерода, которые обычно представлены различными органическими веществами. Источники углерода многочисленны и многообразны. Это, прежде всего, сахара, многоатомные спирты, кислоты. Углерод является составной частью всех органических соединений – белков, пептонов, аминокислот и др. В этой связи специальные дополнительные источники углерода в питательных средах не нужны.

Снабжение бактерий в питательных средах водородом и кислородом обеспечивается за счет воды. Для нормального развития многих групп микроорганизмов необходимы макро- и микроэлементы, потребность в которых удовлетворяется за счет одних и тех же минеральных солей.

Кроме основных компонентов питательной среды (пластических, энергетических, зольных) для нормального развития микробов необходимы еще так называемые «факторы роста». Этими факторами являются в основном витамины группы В. Они играют важную роль регуляторов и стимуляторов обмена веществ у микробов.

При конструировании питательных сред для каждого определенно вида бактерий необходимо учитывать особенности метаболизма их и индивидуальные потребности в тех или других питательных веществах. Среда для одного и того же вида микроорганизмов могут быть разными в зависимости от практических потребностей и задач исследова-

дований. Например, среда для длительного хранения ценных музейных штаммов может значительно отличаться от сред, предназначенных для промышленного изготовления биопрепаратов диагностического, профилактического и лечебного назначения.

Несмотря на громадное количество предложенных сред и их модификаций, к ним предъявляются следующие *общие требования*.

Питательные среды должны содержать необходимые вещества, обеспечивающие метаболизм бактерий. В их состав в обязательном порядке должны входить: органогены (С, N, H, O), макроэлементы (хром, медь, магний, кобальт и др.), ростовые факторы (витамины, гормоны). В рецептуре питательных сред все необходимые вещества должны быть представлены в легкоусвояемой для микробов форме.

Питательные среды, в зависимости от того, для выращивания какого вида бактерий предназначены, должны иметь определенный показатель концентрации водородных ионов – рН. Оптимальный уровень рН при культивировании большинства патогенных микробов колеблется в диапазоне 7,2–7,4.

Среды должны быть изотоничными, т. е. осмотическое давление как внутри бактериальной клетки, так и вне ее должно быть одинаковым. Оптимальным для жизнедеятельности большинства бактерий является давление, соответствующее 0,5%-ному раствору поваренной соли.

Стерильность питательных сред – важнейшее требование, предъявляемое к ним. Изучить биологические свойства микроорганизмов, интересующие исследователя, выделить чистую культуру, идентифицировать ее без стерильных питательных сред невозможно.

Бактериям присущ голофитный способ питания. Питательные вещества поступают в клетку путем диффузии и осмоса. Поэтому питательные среды должны содержать не менее 60 % влаги.

Питательные среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. «соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом рН. Этот индекс показывает насыщение среды кислородом. Для разных микробов нужен различный потенциал. Так, анаэробы размножаются при рН не выше 5, аэробы – при рН не ниже 10» (А. А. Солонко, А. А. Глазкович, В. Н. Алешкевич, Ф. Е. Тимофеев, Н. Х. Федосова, 2000).

Питательные среды по возможности должны содержать одинаковое количество некоторых соединений. Например, для выращивания большинства видов патогенных микробов в средах должно содержать-

ся 0,8–1,2 г/л аминокислот азота, 2,5–3,0 г/л общего азота, 0,5 г/л хлоридов, 1 % пептона.

Для того чтобы следить за ростом бактерий, изучить характер его, визуально обнаруживать рост посторонних микроорганизмов, необходимо, с учетом вида культивируемых микробов, иметь прозрачные среды.

1. Изучить рецепты приготовления наиболее применяемых питательных сред.
2. Ознакомиться с правилами подготовки к стерилизации питательных сред, лабораторной посуды, инструментов.

Питание – важнейшая функция микроорганизма. Благодаря ему в клетке синтезируются сложные вещества – жиры, белки, углеводы, из которых состоит тело микроба.

Процесс питания осуществляется через клеточную оболочку посредством ферментов, а также путем осмоса питательных веществ через нее, как через полупроницаемую мембрану. Для питания микробам необходимы разнообразные питательные вещества, однако обязательным является присутствие так называемых органогенов – кислорода, водорода, углерода, азота.

Для культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях пользуются питательными средами различного состава. В связи с многообразием физиологических особенностей бактерий не представляется возможным приготовить универсальную питательную среду, на которой бы размножались микроорганизмы различных классов.

Однако наличие даже благоприятной питательной среды не является единственным условием для выращивания микробов. Жизнедеятельность их протекает в тесной зависимости от других факторов, например от доступа воздуха. Аэробам необходим кислород, анаэробам, наоборот, он противопоказан, так как они используют молекулярный кислород, получаемый путем отщепления от безазотистых органических веществ.

Культивирование микробов осуществляется с учетом температурного оптимума.

1) должны содержать вещества, необходимые для жизнедеятельности клетки. В состав их должны входить: соли (натрия, калия и других элементов), микроэлементы (цинк, железо, медь, хром и т. д.), органические вещества (азот, углерод, водород, кислород) и факторы роста (витамины, гормоны и т. д.);

2) должны иметь определенную концентрацию водородных ионов. Для большинства видов бактерий показатель pH составляет 7,2–7,4. Кроме того, чтобы во время роста микробов кислые и щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили pH, среды должны содержать вещества, способные нейтрализовать продукты обмена, т. е. обладать буферностью;

3) должны быть изотоничны, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как и внутри микробной клетки. Для большинства микробов среды должны содержать 0,5%-ный раствор натрия хлорида;

4) должны быть стерильными, так как изучать биологические свойства можно только в чистом виде, посторонние микробы изменяют свойства среды;

5) среды (скошенные МПА) должны быть влажными, но не слишком вязкими, так как питание микробов осуществляется за счет осмоса и диффузии;

6) должны содержать постоянные количества отдельных ингредиентов: для культивирования патогенных бактерий – 0,8–1,2 г/л аминного азота (NH_2), 2,5–3,0 г/л общего азота (N), 0,5 г/л хлоридов в пересчете на NaCl, 1 % пептона;

7) жидкие среды, кроме молока, должны быть прозрачными. В связи с этим их подвергают фильтрации.

1. По происхождению среды бывают естественные, искусственные и синтетические. Естественные (натуральные) среды готовят из растительных и животных продуктов, например, из молока, свернутой кровяной сыворотки и др. Искусственные среды готовят из различных ингредиентов – МПА, МПБ и др. (рис. 17–19). Синтетические – из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных дважды в дистиллированной воде.

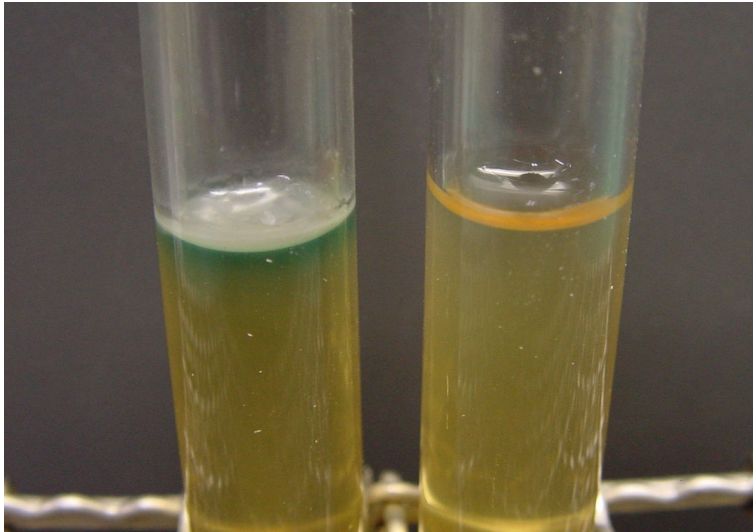


Рис. 17. Простая питательная среда – мясо-пептонный бульон (МПБ)
(слева – рост синегнойной палочки на МПБ)



Рис. 18. Простая питательная среда – мясо-пептонный агар (МПА)
(рост листерий на МПА)



Рис. 19. Простая питательная среда – мясо-пептонный желатин (МПЖ)
(рост возбудителя сибирской язвы на МПЖ)

2. По физическому состоянию среды делятся: на жидкие, полужидкие и плотные. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин. Агар-агар – это полисахарид, получаемый из морских водорослей. Для микробов он не является питательным веществом и служит только для уплотнения среды – связывает большое количество воды. В воде он плавится при температуре 80 – 100 °С, застывает при температуре 40–45 °С.

Желатин – белок животного происхождения, получаемый путем выварки связок, фасций, сухожилий. Среда, содержащая желатин, при температуре 25–30 °С плавится, поэтому культуры на них выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при pH ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Микробы, обладающие протеолитическими свойствами, желатиновые среды разжижают.

3. По назначению среды разделяют: на общепотребительные, пригодные для культивирования многих бактерий; дифференциальные, по-

по 10 мл и стерилизуют при давлении 0,05 МПа (0,5 атм) в течение 30 мин или текучим паром в течение 3 дней.

Для приготовления лакмусового молока к обезжиренному молоку добавляют 5–10 % лакмусовой настойки и столько же 10%-ного раствора соды, чтобы молочная пена приняла сиренево-фиолетовый оттенок. Среду разливают в пробирки и стерилизуют, как молоко.

Для приготовления лакмусовой настойки 5 г сухого лакмуса растирают в ступке в порошок, перенося в колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл этилового спирта, плотно закрывают, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37 °С на 3 дня; ежедневно спирт заменяют свежим. На 4-е сутки спирт сливают, лакмус переносят в чашку Петри, сушат в термостате, после чего порошок помещают в колбу, растворяют в десятикратном количестве дистиллированной воды при подогревании и фильтруют через бумагу.

В случае подготовки среды Эндо к 100 мл расплавленного горячего МПА (рН 7,6) асептически добавляют 1 г химически чистой лактозы, растворенной в 5 мл дистиллированной воды, и перемешивают. Среду охлаждают до температуры 70 °С и прибавляют смесь 0,5 мл раствора насыщенного основного фуксина и 1,25 мл свежеприготовленного раствора сульфита натрия. После перемешивания среду разливают в чашки Петри. Для подсушивания агара чашки ставят в термостат при температуре 37 °С. Среда готовится по мере надобности и не подлежит хранению.

Существуют физические и химические методы.

1. (фламбирования) осуществляется выдерживанием металлических инструментов в пламени спиртовки.

2. – наиболее простой и доступный способ. Режим стерилизации – при температуре 100 °С в течение 20–30 мин.

3. проводится в текучепаровом аппарате Коха, представляющем собой металлический полый цилиндр с двойным дном (это пространство заполнено водой) и крышкой конической формы. Стерилизуемый материал загружают в камеру аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта его с паром. Началом стерилизации считается время с момента закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру. Стерилизация длится от 30 мин до 1 ч в зависимости от характера и предполагаемой загрязненности стерилизуемого материала.

Вместо аппарата Коха можно использовать и автоклав при незавинченной крышке с открытым выпускным краном. Текучим паром стерилизуют главным образом питательные среды, у которых изменяются свойства при температуре свыше 100 °С.

Стерилизацию текучим паром проводят несколько раз, так как однократное прогревание до температуры 100 °С не обеспечивает полной стерилизации. Такая стерилизация называется дробной. Обработку стерилизуемого материала текучим паром проводят в течение 3 дней по 30 мин ежедневно.

4. Стерилизация горячим воздухом (сухим жаром) является основным способом стерилизации стеклянной посуды и осуществляется в сушильном шкафу при температуре 160–180 °С. Сушильные шкафы изготавливаются из термостойких металлов (обычно из металла и асбеста). Внутри шкафа имеются полочки, а наверху – отверстие для вентиляции, которое при стерилизации закрывают. Поддержание необходимой температуры обеспечивается терморегулятором. Режим стерилизации – при температуре 180 °С в течение 1 ч.

5. Питательные среды стерилизуют главным образом автоклавированием. Этот способ основан на прогревании субстрата насыщенным паром при давлении выше атмосферного, при повышении давления пара повышается и его температура. Совместное действие высокой температуры и давления пара обеспечивает надежность стерилизации (при автоклавировании погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов). В режиме стерилизации указывают дополнительное давление 0,5–1 атм. Стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – автоклавах. Они бывают различной конструкции, но принципиально устроены одинаково. Это металлический двустенный котел, способный выдерживать высокое давление.

Температура и длительность автоклавирования определяются составом среды. Субстраты, содержащие вещества, не выдерживающие нагревания до температуры 120 °С (1,0 атм), стерилизуют при температуре 110 °С (0,5 атм); молочно-дрожжевой автолизат, среды с желатином – при давлении 0,5 атм в течение 20–30 мин; мясо-пептонный агар – при давлении 1 атм в течение 20–30 мин; картофельную среду и почвенные вытяжки – при давлении 1,5 атм в течение 30 мин.

6. – дробная стерилизация питательных сред, содержащих куриные яйца, кровяную сыворотку и разрушающихся при высокой температуре. Режим тиндализации – температура 56–58 °С в течение 5–6 дней подряд по 40 мин, можно по 2 ч в 1-й день и по 1 ч в последующие 4–5 дней. В промежутке между прогреваниями обраба-

тываемый материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор в вегетативные формы, которые убиваются последующими нагреваниями.

7. – метод неполной стерилизации – используется в микробиологической практике для выделения спорообразующих микроорганизмов, а в пищевой промышленности – для обработки продуктов, теряющих вкусовые качества при кипячении (молоко, соки, вино, пиво).

Различают длительную пастеризацию – 30 мин при температуре 65 °С, кратковременную – 20 с при температуре 75 °С, моментальную – без выдержки при температуре 85–90 °С. При пастеризации погибают только вегетативные формы микробов, споры сохраняются. Пастеризованные продукты охлаждают до температуры 4–5 °С, чтобы предотвратить прорастание спор.

8. – стерилизация с помощью бактериальных ультрафильтров – применяется для стерилизации жидкостей, которые не могут подвергаться воздействию температуры. Способ заключается в фильтровании их через специальные фильтры, задерживающие клетки бактерий.

Фильтры изготавливаются из каолина, асбеста, керамики, нитроцеллюлозы, т. е. из таких материалов, которые обладают настолько мелкими порами, что задерживают на своей поверхности все микробы. Наибольшее применение в настоящее время находят асбестовые и мембранные фильтры из нитроцеллюлозы.

9. При такой стерилизации используют бактерицидные лампы для обеззараживания воздуха в помещениях (боксах, операционных). Их применяют в пищевой промышленности для хранения различных продуктов при температуре выше 0 °С.

10. Ультразвук является физическим стерилизующим фактором и используется, например, для обеззараживания воды, молока, некоторых продуктов, козевенного сырья. Стерилизующее действие его связано с разрушением бактериальной клетки под действием возникающих в цитоплазме кавитационных пузырьков.

11. (хлороформ, толуол, эфир, фенол, формалин, борная кислота, глицерин) применяется с ограничениями, чаще для консервирования с целью предупреждения бактериального загрязнения сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.).

Таким образом, лабораторные материалы стерилизуют следующими способами: основные питательные среды – автоклавированием; среды и растворы, содержащие углеводы и термолабильные вещества, – дробной стерилизацией; белковые среды – окисью этилена, фильтрованием, тиндализацией; чистую лабораторную посуду, термостойкие шприцы – сухим жаром; использованную посуду, среды, культуры, заразный материал, предметы из металла, стекла, термостойких пластмасс – автоклавированием; бывшие в употреблении пипетки, банки – химическими веществами; воздух – фильтрованием, облучением, сухим жаром.

1. Студенты работают группами (по 2–3 человека) под контролем преподавателя. Одна группа готовит мясную воду. Другие группы приготавливают из мясной воды мясо-пептонный агар и мясо-пептонный бульон. Устанавливают реакцию среды рН 7,4–7,5 путем подщелачивания. Среда кипятят, фильтруют и разливают в пробирки вместимостью 10 мл. Помещают в аппарат Коха для стерилизации.

2. Отрабатывают технику обеззараживания бактериологических петель, пастеровских пипеток, пинцетов, шпателей и других инструментов методом фламбирования.

3. Осваивают технику подготовки лабораторной посуды, металлических инструментов, пипеток, ватно-марлевых пробок к стерилизации.

1. Как осуществляется питание микроорганизмов? Какие типы питания микробов вы знаете?

2. Какие требования предъявляются к питательным средам?

3. Техника приготовления препаратов-мазков из бактериальных культур, выращенных на плотных и жидких питательных средах.

4. Классификация питательных сред по происхождению, по физическому состоянию и по целевому назначению среды.

5. Классификация и характеристика питательных сред для микроорганизмов.

6. Методы стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и инструментов.

7. Назовите ингредиенты общеупотребительных питательных сред. Приготовление общеупотребительных (обычных или простых) питательных сред.

8. Опишите технику приготовления МПА, МПБ, сред с углеводами.
9. Какие физические методы стерилизации обеспечивают полную стерильность?
10. Химические методы стерилизации. Дезинфекция.
11. Аппаратура, используемая для различных видов стерилизации.
12. Что такое пастеризация? Где она используется?
13. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами и ультразвуком.
14. Какой метод стерилизации используется для обработки продуктов, теряющих вкусовые качества при кипячении? В чем состоит его сущность?
15. Перечислите основные цели применения питательных сред в микробиологической практике.

отработать технику посева микроорганизмов на различные питательные среды; изучить режимы культивирования микроорганизмов.

пробирки с микробной культурой (молочнокислый стрептококк, ацидофильная палочка, сенная бацилла), пробирки с мясо-пептонным бульоном, чашки Петри, мясо-пептонный агар; микробиологические пегли, восковой карандаш, микробиологические иглы, шпатели; пробирки с мясо-пептонным агаром столбиком; термостат, горелки, анаэроустат, прибор Аристовского; демонстрационные таблицы.

Для роста и размножения микроорганизмов на естественных и искусственных питательных средах необходимы определенные температурные условия.

Наиболее благоприятной для большинства патогенных микробов является температура 37 °С, плесневых грибов – 20–25, сапрофитов – 25–30, термофилов – 40–45 °С.

Для культивирования микробов при постоянной температуре применяют термостаты.

Термостат состоит из корпуса, рабочей камеры, электромонтажного блока, который осуществляет автоматическое терморегулирование.

По характеру дыхания все микробы делятся на *аэробов* и *анаэробов*. Аэробы для своего существования нуждаются в молекулярном кислороде воздуха. Для культивирования анаэробов необходимо создать определенные условия, т. е. удалить молекулярный кислород из питательной среды и пространства, окружающего эти культуры.

Наиболее простым способом удаления растворенного кислорода является кипячение среды. Непосредственно перед посевом материала пробирки со средами кипятят на водяной бане в течение 15–20 мин. Быстро охлаждают и для уменьшения диффузии кислорода из воздуха питательные среды заливают сверху стерильным вазелиновым маслом (толщина слоя – 1,0–1,5 см).

Активно связываются с кислородом животные ткани паренхиматозных органов (среда Китта – Тароцци). В жидкие питательные среды иногда помещают пористые вещества: вату, пемзу, которые адсорбируют на своей поверхности пузырьки воздуха.

Приборы для культивирования анаэробов: прибор Аристовского, анаэростат.

Прибор Аристовского представляет собой металлический цилиндр, диаметр которого соответствует диаметру чашек Петри. Поглощение кислорода осуществляется химическими поглотителями.

Две половинки от чашки Петри наполняют углекислой содой, на поверхность которой насыпают тонкий слой гидросульфита натрия в количестве 1,5 г и слегка увлажняют водой из пульвелизатора. Одну половину чашки с содой ставят на дно ведерка и на нее помещают чашки Петри с посевами; вторую половину чашки помещают поверх засеянных чашек. После этого ведро опускают в аппарат, герметически закрывают его крышкой и ставят в термостат.

Анаэростат представляет собой толстостенный металлический цилиндр с герметически привинчивающейся крышкой, на которой имеются вакуумметр и два крана для присоединения к вакуум-насосу. В прибор помещают чашки с посевами, откачивают воздух, кран закрывают и помещают в термостат для культивирования.

1. Произвести посевы аэробных микроорганизмов на МПБ, МПА, МПЖ.

2. Освоить методы культивирования анаэробов.

3. Изучить режимы культивирования микроорганизмов различных видов.

Посевы для культивирования аэробов осуществляют как из нативного, присылаемого в лабораторию материала, так и из уже имеющихся бактериальных культур. Питательные среды должны быть стерильными. Посевы из проб материала, поступившего в лабораторию, проводят пастеровской пипеткой, из бактериальной массы – бактериологической петлей. Посев обязательно нужно делать над пламенем горелки. На засеваемых чашках Петри, колбах или пробирках пишут номер экспертизы, под которым зарегистрирован поступивший материал. При *посеве в жидкие среды* (МПБ, молоко) пробирку с исследуемым материалом и пробирку с питательной средой держат в левой руке, как при приготовлении препарата-мазка, в правой руке находится петля или пипетка для переноса материала в среду из одной пробирки в другую (рис. 20).

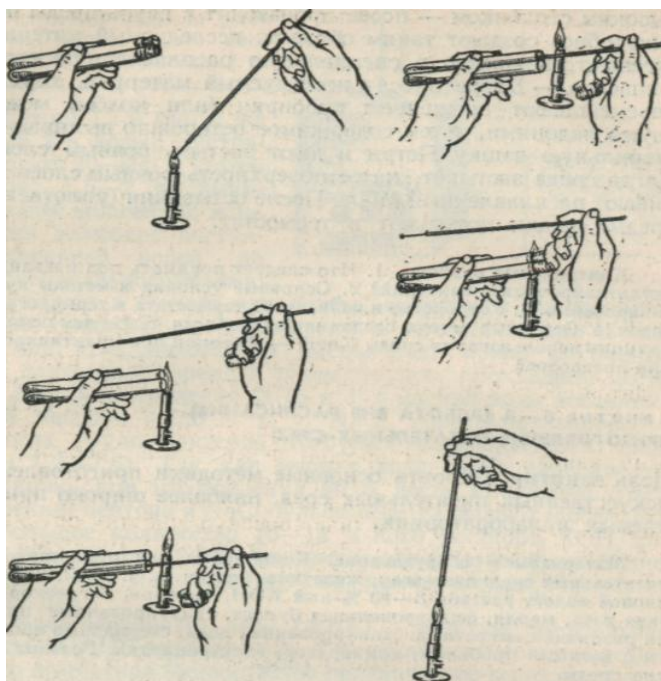


Рис. 20. Пересев из одной пробирки в другую

Около пламени горелки петлю (или пипетку) вносят в пробирку с материалом, берут одну каплю, затем осторожно переносят в пробирку со стерильной средой, слегка погружая в нее, затем осторожно вынимают, закрывают пробками пробирки, петлю обжигают на пламени горелки (пастеровскую пипетку опускают в банку с дезраствором – фенол, формалин). Во время работы следят, чтобы не намокали пробки.

При *посеве на плотную среду* пробирки с засеваемой микробной культурой и стерильной питательной средой (МПА) берут в левую руку, держат скошенной поверхностью МПА вверх, пробками в сторону пламени горелки. В открытую у пламени пробирку с засеваемой микробной культурой (или другим материалом) осторожно опускают петлю, слегка прикасаясь к поверхности содержимого пробирки, и, взяв одну каплю, переносят ее в другую пробирку со стерильной средой. Петлю опускают до дна пробирки, погружают в конденсационную жидкость и производят посев штрихом – зигзагообразными движениями петлей проводят вверх по поверхности среды. Пробирки закрывают, петлю прожигают. Все засеянные пробирки ставят в термостат для культивирования, через 16–18 или 24–48 ч учитывают результат (рис. 21).

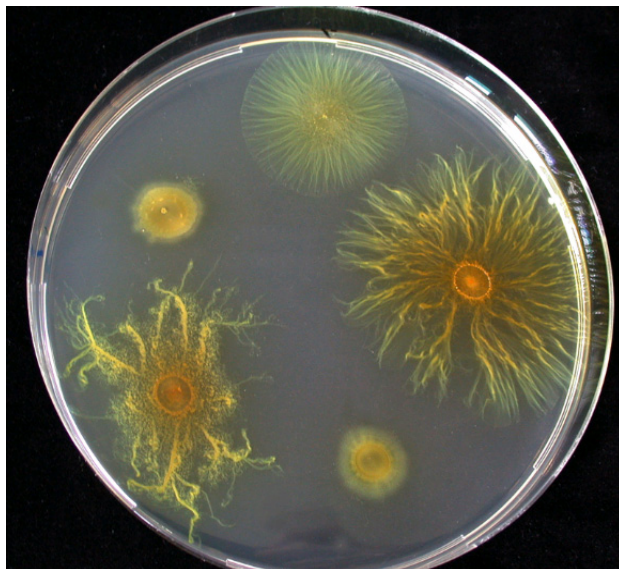


Рис. 21. Культивирование микроорганизмов: колонии микроорганизмов на плотной питательной среде

Техника посевов для культивирования анаэробов такая же, как и аэробов, но, помимо описанных методов создания для них условий анаэробнозиса, применяют и другие: используют жидкую питательную среду – мясо-пептонный печеночный бульон (среда Китта – Тароцци) – на дне пробирки помещены кусочки вареной печени, сверху среда залита слоем (1–2 см) вазелинового масла. Перед посевом эту среду нужно регенерировать. Для этого пробирки со средой следует прокипятить в водяной бане, затем быстро охладить под струей холодной (водопроводной) воды.

При кипячении кислород воздуха из среды удаляется, вазелиновое масло ограждает от проникновения кислорода извне. Кусочки печени обеспечивают анаэробов связанным (атомарным) кислородом за счет «тиосистемы» печеночных клеток.

Кроме того, анаэробы культивируют (без использования эксикатора, анаэроостата) в полужидкой среде высоким столбиком – посев производят в глубь среды, или анаэробнозис создают таким образом: исследуемый материал засевают, например, в специальную расплавленную среду Вильсона – Блера, хорошо перемешивают вращением пробирки (или колбы) между двумя ладонями, затем содержимое осторожно выливают в стерильную чашку Петри и дают застыть ровным слоем. Когда среда застынет, на ее поверхность ровным слоем наливают расплавленный МПА. После остывания (уплотнения среды) чашки помещают в термостат.

Посев петлей на среду в чашку Петри. Для равномерного распределения микроорганизмов в жидкой среде пробирку с культурой осторожно, чтобы не смочить пробку, встряхивают или, зажав между ладонями, вращают в одну, а затем в другую сторону.

Пробирку с культурой бактерий держат в левой руке, а бактериологическую петлю – в правой. Петлю обеззараживают над пламенем горелки.

Края пробирки при вынимании пробки прижигают. Пробку прижимают мизинцем правой руки к ладони и после извлечения держат в руке. Петлю осторожно вводят в пробирку с культурой и охлаждают. При взятии материала на петле образуется тонкая прозрачная пленка – «зеркальце». Чашку Петри с агаровой средой, заранее подписанную, приоткрывают под углом во избежание попадания микробов извне. Бактериологическую петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и проводят зигзагообразные штрихи по всей поверхности среды.

Штрихи, наносимые петлей, располагают как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микробов.

Окончив посев, петлю фламбируют, чтобы уничтожить оставшиеся микробы, предварительно обеззаразив край и ту часть пробки, которая входит в горлышко пробирки.

Чашку Петри с посевами переворачивают вверх дном, во избежание размыва колоний конденсационной водой, и помещают в термостат для культивирования.

Посев в толщу питательной среды. Из бактериальной культуры, подлежащей посеву, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или физиологическом растворе.

Набирают культуру бактерий стерильной пипеткой в объеме 0,1; 0,5 или 1,0 мл (в зависимости от предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Чашку заливают 10–15 мл мясо-пептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40–45 °С. Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку слегка вращают круговыми движениями по поверхности стола. После застывания чашку Петри со стороны дна подписывают, переворачивают вверх дном и ставят в термостат для культивирования.

Посев уколом в столбик питательной среды. Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку и в центр столбика до дна пробирки правой рукой вкалывают петлю с находящимся на ней материалом. Пробирку закрывают пробкой, в верхней третьей части подписывают восковым карандашом. В штативах помещают в термостат для инкубирования.

Посев шпателем на среду в чашку Петри. Исследуемую микробную культуру наносят на поверхность питательной среды у края чашки. Стерильным шпателем распределяют посевной материал равномерно по всей поверхности среды. Чашку подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат для выращивания.

При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев «газоном» делают в том случае, когда нужно получить большое количество микробной культуры одного вида.

Посев в жидкие питательные среды. При посеве и пересеве в жидкую питательную среду обе пробирки (одна с исследуемой культурой,

другая с питательной средой) берут в левую руку между большим и указательным пальцами так, чтобы их основания находились поверх кисти руки.

Все действия проводят над пламенем горелки (радиус равен 10–15 см). Пробки из пробирок вынимают мизинцем и безымянным пальцами правой руки. Края пробирок при вынимании пробок прижигают. Остальные три пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериологической петли или пипетки, посредством которых материал переносят из одной пробирки в другую и распределяют в питательной среде.

Бактериальную петлю прокаливают над пламенем горелки. Чтобы остудить горячую петлю, ее вводят в глубь пробирки и погружают в конденсационную жидкость. При взятии петлей материала для посева должна образоваться в кольце петли тонкая пленка – «зеркальце». Петлю с посевным материалом погружают в питательную среду.

Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке пробирки и смывают жидкой средой. Пробирку закрывают пробкой, предварительно профламбировав края. Петлю обеззараживают и ставят в штатив. Пробирку с посевами подписывают, ставят в штатив и помещают в термостат для культивирования.

1. В чем заключается сущность микробиологического метода исследований?
2. Техника посева микроорганизмов на плотные питательные среды.
3. Техника посева микроорганизмов на жидкие питательные среды.
4. Какие методы культивирования анаэробов вы знаете?
5. Перечислите режимы культивирования микроорганизмов.
6. Назовите приборы, используемые для культивирования анаэробов. Опишите их.
7. Опишите посев в толщу питательной среды.
8. Как проводится посев в жидкие питательные среды?
9. Как проводится перенос материала из одной пробки в другую?
10. Назовите приборы для культивирования анаэробов. Опишите их.
11. Сущность техники посевов для культивирования анаэробов.
12. Как проводятся посевы аэробных микроорганизмов на МПБ, МПА, МПЖ?

13. Как проводится посев в толщу питательной среды?
14. Какова наиболее благоприятная для большинства патогенных микробов температура?
15. Для чего предназначены термостаты?

изучить особенности роста микроорганизмов на различных питательных средах; изучить методы выделения чистых культур.

посевы культур микроорганизмов на различные питательные среды, сделанные студентами на предыдущем занятии; бактериологические петли, предметные стекла; набор красок для окрашивания микроорганизмов; пробирки с 9 мл стерильной воды или изотонического раствора хлорида натрия; стеклянные шпатели, микробиологические пипетки, восковые карандаши; суспензии смешанных культур микробов; микроскопы, газовые горелки, термостат; демонстрационные таблицы.

Культуральные признаки микроорганизмов определяются характером роста их на плотных, жидких и полужидких питательных средах. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и поэтому являются важным видовым признаком.

Выращивание бактерий в искусственных условиях положило начало целому направлению их изучения – исследованию бактериальных культур и их свойств. Выяснилось, что существуют выраженные видовые различия в форме колоний и типе роста бактерий при их выращивании на плотной и жидкой питательных средах. Микробиология, начавшая свое развитие в момент, когда интересные для исследователя бактерии стало возможно вырастить *in vitro* (т. е. в стекле), до сих пор изучает культуральные свойства бактерий – их особенности при выращивании в лабораторных условиях.

Описывая разновидности бактерий, ученые указывают на их *морфологические, биохимические, культуральные и серологические свойства.*

1. *Морфология* бактериальных клеток изучается при исследовании мазков или «висячих капель» под микроскопом. Она обычно не позволяет однозначно идентифицировать вид бактерий, при исследовании устанавливаются только их морфологические признаки – размер, окраска по Граму, наличие капсулы, спор, ворсинок и жгутиков, геометрическая форма. В зависимости от того, какие свойства описывает морфология, она может быть микро- или макроморфологией. Первая занимается описанием клеток, вторая – описанием внешнего вида колоний.

2. *Культуральные свойства*. К культуральным свойствам относятся внешний вид и форма колоний (это называется морфологией колоний), способ роста на плотной и жидкой питательных средах, требования к их составу, характеризующие потребность бактериальных колоний в субстратах и витаминах, аэробных или анаэробных условиях.

3. *Биохимические свойства бактерий*. Это ферментативные особенности (способность превращать одни вещества в другие с помощью характерных для данного представителя ферментов), а также их состав с точки зрения присутствия уникальных для конкретного вида или группы веществ.

4. *Серологические свойства*. Изучение их позволяет поставить окончательную точку в определении видовой и штаммовой принадлежности колонии. Применяемые для серологической идентификации методы позволяют обнаружить характерные поверхностные антигены и по ним классифицировать бактериальную культуру.

Культуральную характеристику роста бактериальных колоний на питательной среде дают после их визуального осмотра. Они могут иметь массу морфологических и культуральных различий, кроме того, способны меняться с течением времени.

Молодые и старые колонии бактерий всегда описывают по культуральным свойствам отдельно.

1. *Форма*. Бактериальные колонии по этой культуральной характеристике могут быть плоскими, округлыми, ризоидными (напомянуть переплетение корней) или гирозными, напоминающими по форме головной мозг, иметь ровные, хорошо очерченные или рваные края.

2. *Размер*. Важная характеристика морфологии колоний. Различают мелкие колонии диаметром 1–3 мм, средние размером от 2 до 4 мм и крупные, размер которых составляет 4 мм и более.

3. *Пропускание света*. Бывают просвечивающие, или прозрачные, и непрозрачные бактериальные колонии.

4. *Поверхность*. Может быть шероховатой или гладкой, морщинистой, блестящей, влажной, тусклой, слизистой или сухой.

5. *Структура.* При изучении под микроскопом можно увидеть колонии различной морфологии – однородные, нитевидные или зернистые. Методы определения – микроскопия или исследование с помощью лупы.

6. *Цвет.* Эта культуральная характеристика выявляется при наличии в бактериальных клетках пигментов. *Цвет колоний иногда является видовым признаком и входит в название.* Например, золотистый стафилококк, цианобактерии, пурпурные бактерии, синегнойная палочка и др. получили свои названия из-за характерной окраски их колоний, выращенных на питательной среде. Иногда пигменты бактерий выделяются в субстрат и окрашивают его.

7. *Консистенция.* Определяется при непосредственном контакте с колонией специального инструмента. Различают слизистые, мягкие, плотные и врастающие в агар.

8. *Профиль колонии.* Может быть выпуклым или плоским, кратерообразным или конусовидным.

9. *Степень погружения в среду.* Большинство колоний живет на поверхности субстрата. Однако существуют также глубинные, в виде чечевичек, погруженных в толщу среды, и донные бактерии, образующие пленки на дне сосудов с питательной средой.

10. *Люминесценция.* Известно также несколько видов аэробных бактерий, способных к фосфоресценции (люминесценции). Их колонии способны до суток светиться желтоватым или зеленоватым цветом. Фотобактерии – жители различных водоемов, встречаются на чешуе и мясе рыбы. Их морфология может быть различной – среди светящихся видов встречаются кокки, вибрионы, палочки.

11. *В жидком субстрате морфология бактериальных колоний* характеризуется образованием равномерной мути, пленки или осадка. В полужидких средах при посеве уколами подвижные бактерии вызывают помутнение в толще среды вокруг места посева, а неподвижные – только в самом месте укола. Некоторые бактерии в аэробных и анаэробных условиях выделяют различные газы (индол, скатол, меркаптан, сероводород, масляная кислота, диэтиловый эфир и т. п.).

Методы выращивания бактерий с целью выявления их культуральных свойств часто требуют применения субстратов различной плотности.

Различают *жидкие, полужидкие и плотные питательные среды.*

1. *Жидкие.* Готовятся на основе растворов или гидролизатов.

2. *Полужидкие.* Требуют обязательного добавления веществ-уплотнителей в относительно небольшой концентрации. Так, агар-агар (малайское желе) в них добавляют в концентрации от 0,3 до 0,7 %.

3. *Плотные*. Содержат большое количество веществ-уплотнителей. Чаще всего это агар-агар в концентрации от 1,5 до 3 %, реже – желатин в концентрации от 10 до 20 %. Желатин применяется относительно редко, так как плавится при температуре гораздо меньшей, чем нормальная температура культивирования.

В зависимости от состава питательные среды делят на среды с определенным составом или синтетические, приготовленные в промышленных или лабораторных условиях из известных компонентов, и те, состав которых не может быть определен точно – это растительные и животные природные субстраты (например, картофель, морковь, молоко или экстракты, полученные из них).

С точки зрения целей использования различают *общие (общеупотребительные), селективные, обогащенные, специальные и дифференциально-диагностические среды*.

1. *Общие*. Применяются для культивирования неприхотливых культур. Это, например, мясная вода, перевар Хоттингера или мясо-пептонный бульон, гидролизаты кормовых дрожжей или кильки и плотные среды, полученные при добавлении к данным бульонам агара.

2. *Обогащенные*. Содержат добавки – кровь, ее сыворотку, специально подобранные углеводы.

3. *Специальные*. Подобранные по составу для конкретного вида бактерий. Например, для возбудителя туляремии используется среда Мак-Коя с добавлением специально подготовленных яиц, а для лептоспир – среда Терских на основе фосфатов.

4. *Селективные* (еще их называют селективными). Предназначены для отбора из смешанной популяции бактерий одного вида. Такие субстраты могут содержать компоненты, усиливающие рост искомого микроорганизма либо подавляющие рост остальной микрофлоры. Например, молочно-солевой агар, предназначенный для отбора стафилококков, или среды Шустова, Раппопорт и Мюллера для выращивания сальмонелл.

5. *Дифференциально-диагностические*. Позволяют определять наличие различных ферментов у бактерий. Могут быть различной консистенции. Наиболее известны среды Гисса, Левина, Эндо, содержащие различные субстраты для бактериальных ферментов – лактозу, галактозу, тиосульфат натрия и цветные индикаторы.

Методы культивирования аэробных и анаэробных бактерий с целью изучения их культуральных свойств существенно различаются между собой. Для аэробных бактерий применяются термостаты, шют-

тель-аппараты, колбы, бутылки и реакторы. Для анаэробных используются высокие концентрации веществ, повышающих восстановительный потенциал среды, и специальные жидкие или газовые среды. В качестве специального оборудования используются анаэроостаты.

Кипячение субстратов позволяет удалить из них кислород. Часто применяется метод выращивания анаэробов в толще питательных сред, что необходимо для выявления культуральных свойств бактерий.

1. Описать культуральные свойства микроорганизмов, культивируемых на плотных, жидких и полужидких питательных средах.

2. Выделить чистую культуру микроорганизмов методом посева, разведения, применения элективных питательных сред.

3. Приготовить препараты-мазки. Окрасить по Граму. Микроскопировать и зарисовать в тетради.

Чашки с посевами просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и исследуют колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и суженой диафрагмой.

Колонии характеризуют по следующим признакам: размерам, форме, прозрачности, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Размеры колоний определяются их диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии: точечные (диаметром меньше 1 мм), мелкие (диаметром 1–2 мм), средние (диаметром 2–4 мм), крупные (диаметром 4–6 мм и более).

Форма колоний: круглая, овальная, ветвистая, амёбовидная и др.

Характер контура края колоний: ровный, изрезанный, лопастный, локонообразный, бахромчатый и т. д.

Рельеф колоний характеризуется приподнятостью их над поверхностью среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или с помощью лупы при рассмотрении ее сверху и сбоку. Различают колонии: каплеобразные, куполообразные, конусообразные, с вдавленным центром.

Поверхность колоний: ровная или складчатая, матовая или блестящая, сухая или влажная и т. д.

Прозрачность колоний: прозрачные или непрозрачные в разной степени.

Консистенция колоний: пастообразная, вязкая, слизистая, волокнистая, плотная, хрупкая, сухая и т. д. Консистенцию колонии определяют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериологической петлей.

Цвет колоний: определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Красный цвет образуют некоторые актиномицеты, дрожжи, бактерии. Синий цвет продуцирует синегнойная палочка, желтый и золотисто-желтый образуют стафилококки, сарцины. Черные и бурые пигменты вырабатывают некоторые грибы, азотобактер и другие микроорганизмы.

Большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета.

Поверхностный рост: пристеночное кольцо, нежная пленка, грубая морщинистая пленка, поверхностный рост отсутствует.

Помутнение: слабое, умеренное, сильное, стойкое, отсутствует.

Осадок: плотный, зернистый, вязкий, в виде клочка ваты, в виде хлопьев, крошковатый и т. д.

Количество осадка: обильное, скудное, отсутствует.

Цвет среды: не изменен, изменен (приобретает окраску пигмента, образуемого микроорганизмом).

Газообразование: наличие или отсутствие пузырьков газа.

Форма колоний: круглая, овальная, разветвленная.

Размеры колоний: точечные, средние, крупные.

Края колоний: ровные, разорванные, лопастные, зубчатые.

Поверхность колоний: матовая, блестящая, ровная или складчатая.

Разжижение: быстрое, медленное, отсутствует.

В верхней части растут аэробы, в нижней – анаэробы.

Стержень: длинный, короткий, в виде плоской ленты и т. д.

Боковые отростки: длинные, короткие, в виде ершика, елочки, елочки вершиной вниз и т. д.

Разжижение: не разжижает, разжижает полностью, послойно, воронкой, кратером и т. д.

Газообразование: наличие или отсутствие пузырьков.

Чистой культурой микроорганизмов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду.

Примером чистой культуры может служить изолированная колония, которую принято рассматривать как потомство одной клетки, попавшей на данный участок питательной среды.

Выделение чистой культуры является важным этапом бактериологического исследования. Она необходима для изучения основных морфологических, культуральных и биохимических признаков, по совокупности которых определяется видовая принадлежность микроорганизмов.

Чистая культура микроорганизмов необходима для приготовления лечебных сывороток, профилактических вакцин, диагностических препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, ферментов, антибиотиков, кормового белка и других веществ.

Описывают характер роста микроорганизмов, культивируемых на различных питательных средах, по предложенным схемам. Зарисовывают в тетради особенности роста микробов на плотной питательной среде.

Из описанных колоний готовят мазки. Окрашивают сложным методом по Граму. Микроскопируют. Определяют видовую принадлежность. Зарисовывают в тетради.

1. *Метод посева (фракционный метод)*. Берут несколько чашек Петри с плотной питательной средой (МПА). На агар в центре первой чашки наносят пастеровской пипеткой каплю исследуемой культуры и стерильным шпателем распределяют ее по всей поверхности среды.

Не фламбуруя шпатель, быстро переносят его во вторую чашку и распределяют оставшийся на нем материал по всей поверхности агара. Затем этим же шпателем производят посев в третью и четвертую чашки. Когда посев закончен, шпатель обжигают над пламенем горелки. Чашки маркируют и ставят в термостат вверх дном на 18–24 ч.

В последние чашки попадает меньше микробов, а следовательно, меньше вырастает колоний. Они могут быть изолированы, что позволяет выделить чистую культуру. При посеве происходит механическое разделение микроорганизмов.

2. *Метод разведения*. Исследуемый материал разводят в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. 1 мл исследуемого материала стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл физиологического раствора. Получают разведение 10^{-1} . Из пробирки с разведением 10^{-1} 1 мл переносят в пробирку с 9 мл физиологического раствора. По-

лучают разведение 10^{-2} . Аналогично приготавливают последующие разведения: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и т. д.

С увеличением степени разведения число микробов уменьшается, что позволяет изолировать отдельные бактериальные клетки и выделить культуру в чистом виде.

Из последних разведений культуры делают посевы в чашки Петри бактериологической петлей. Чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 18–24 ч.

Чашки с посевами просматривают, сходные между собой колонии описывают, делают препараты-мазки, окрашивают и микроскопируют. При однородности культуры делают пересев.

3. *Метод применения элективных питательных сред.* Не все микроорганизмы растут на простых питательных средах. Для выделения и накопления микробов определенного вида используют элективные, или избирательные, среды.

Элективной средой для молочнокислых бактерий может быть молоко. Плесневые грибы и дрожжи выращивают на средах с содержанием углеводов (пивное сусло, сусло-агар).

Для культивирования микобактерий применяют плотную яично-молочную среду Петраньяни.

На картофельной среде Рушмана выращивают маслянокислые бактерии.

Среда Китта – Тароцци применяется для культивирования анаэробов.

Делают посевы на элективные питательные среды суспензии смешанных бактериальных культур.

Культивируют в термостате при температуре 35–37 °С в течение 18–24 ч. Просматривают посевы, описывают культуральные свойства выросших колоний, готовят микроскопические препараты, окрашивают и микроскопируют. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

1. Перечислите культуральные свойства микроорганизмов.
2. По каким признакам характеризуют колонии микробов?
3. Особенности роста микроорганизмов на плотных питательных средах.
4. Характер роста микробов на жидких питательных средах.
5. Особенности микробного роста на полужидких питательных средах.

6. Рост микроорганизмов по уколу.
7. Понятие «чистая культура».
8. Применение чистых культур в животноводстве, ветеринарии, медицине, народном хозяйстве.
9. Элективные питательные среды.
10. Методы выделения чистых культур.
11. Как выделить чистую культуру при бактериологическом исследовании?
12. В чем заключается сущность роста микробов на полужидких питательных средах?
13. Элективная среда для молочнокислых бактерий.
14. Для культивирования каких бактерий применяют плотную яично-молочную среду Петраньяни?
15. Какая температура необходима для культивирования микобактерий?
16. Размер, форма и рельеф колоний микроорганизмов.

изучить влияние физических, химических и биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов; определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам.

пробирки с культурами микробов (гнилостная микрофлора, молочнокислая микрофлора); мясо-пептонный агар, мясо-пептонный агар с глюкозой; чашки Петри, бактериологические петли; 0,1 н. раствор кислоты, 0,1 н. раствор щелочи, 1%-ный раствор хлорной извести; набор бумажных дисков, пропитанных различными антибиотиками (пенициллин, ампициллин, оксациллин, стрептомицин, левомицетин и др.); стерильные пинцеты; дистиллированная вода; шпатели, восковые карандаши, горелки, термостаты; демонстрационные таблицы.

Микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию факторов внешней среды. Температура – наиболее важный фактор в жизни мик-

робов. Она может быть оптимальной, т. е. наиболее благоприятной для развития, а также максимальной, при которой подавляются жизненные процессы, и минимальной, ведущей к замедлению или прекращению роста.

По отношению к температуре микроорганизмы делят на три группы:

1. *Психрофилы* (холодолобивые микроорганизмы) растут при низких температурах (от +15 до –8 °С), распространены в северных морях, ледниках, холодильниках и других местах. Среди них могут быть возбудители болезней рыб и водных растений, микроорганизмы, разлагающие пищевые продукты.

2. *Мезофилы* развиваются при средних температурах от 20 до 40 °С. Они являются возбудителями болезней животных и человека, вызывают процессы брожения, аммонификации и др.

3. *Термофилы* (теплолюбивые) растут при высоких температурах от 40 до 80 °С. Обитают в горячих источниках, в почвах районов с жарким климатом, пищеварительном тракте животных. Участвуют в процессах приготовления бурого сена, силосования кормов, биологического обеззараживания навоза и т. д.

Микроорганизмы приспособились к определенной среде обитания. Большинство микробов предпочитает среду, в которой концентрация водородных ионов ближе к нейтральной (рН 6,5–7,5).

В условиях лаборатории микроорганизмы культивируют на средах, содержащих определенное количество водородных ионов. Для этого в среды добавляют химические вещества: щелочи – для повышения уровня рН, кислоты – для понижения уровня рН. Оптимальный уровень рН среды для молочнокислых микроорганизмов равен 4,0–4,5, плесневых грибов – 4,0–4,5, ацидофильной палочки – 4,0–5,5, кишечной палочки – 6,5–7,8.

Растворы щелочей и кислот оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы, вызывают денатурацию белков, разрушают углеводы. Растворы хлорной извести окисляют компоненты микробной клетки, в результате наступает ее гибель. Формалин – 40%-ный водный раствор формальдегида – вызывает денатурацию белков, губительно действует на все формы микроорганизмов.

Между микроорганизмами и другими живыми организмами существуют разнообразные взаимоотношения: симбиоз, комменсализм, метабиоз, сателлизм, синергизм, антагонизм, паразитизм и др.

– это специфические соединения, способные в значительных количествах избирательно задерживать рост микробов или убивать их. Антибиотические вещества образуются микроорганизмами: актиномицетами, плесневыми грибами, бактериями, а также растениями и животными. Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. С. А. Ваксманом для обозначения веществ, образующихся микроорганизмами и обладающих антимикробным действием. Впоследствии многие исследователи предлагали свои формулировки, вкладывая в них подчас слишком ограниченное содержание либо чрезмерно расширяя это понятие.

Антибиотики пришли в нашу жизнь как избавление от инфекций, мучивших человечество тысячи лет. Без антибиотиков не обойтись, если речь идет о жизни и смерти человека. По-прежнему они являются «центровыми» в преодолении сепсиса, интоксикации, туберкулеза. Пока не существует других препаратов, способных так мощно и быстро справиться с инфекцией, угрожающей жизни.

Антибиотики незаменимы при остром развитии болезни – ангины и пневмонии, а также при инфекционном воспалении, которое локализуется в закрытых полостях (отит, гайморит, остеомиелит, абсцесс, флегмона). Часто приходится назначать антибиотики людям после хирургических операций.

Без применения антибиотиков нередко развиваются серьезные осложнения. Например, если лечение пневмонии или гайморита прошло без участия этих препаратов, могут возникнуть хронические вялотекущие заболевания.

Антибиотики позволили успешно бороться со многими инфекциями и кишечными расстройствами, неизбежными в промышленном животноводстве и птицеводстве. Они заметно улучшили привесы, конверсию корма и повысили сохранность поголовья.

Антибиотики занимают особое место в современной медицине. Они являются объектом изучения различных биологических и химических дисциплин. Наука об антибиотиках развивается бурно. Если это развитие началось с микробиологии, то теперь проблему изучают не только микробиологи, но и фармакологи, биохимики, химики, радиобиологи, врачи всех специальностей.

- высокая избирательность антимикробного препарата в дозах, не токсичных для макроорганизма;

- отсутствие или медленное развитие резистентности возбудителей к препарату в процессе его применения;

- сохранение антимикробного эффекта в жидкостях организма, экссудатах и тканях, отсутствие или низкий уровень инактивации белками сыворотки крови, тканевыми энзимами;

- хорошее всасывание, распределение и выведение препарата, обеспечивающие терапевтические концентрации в крови, тканях и жидкостях организма, которые должны быстро достигаться и поддерживаться в течение длительного периода;

- удобная лекарственная форма для применения различным возрастным группам животных, обеспечивающая максимальный эффект и стабильность в обычных условиях хранения.

В целях наиболее эффективного использования антибиотиков при лечении различных по своей этиологии заболеваний, уменьшения их побочного действия на организм и снижения выработки устойчивости к ним у патогенных микроорганизмов необходимо соблюдать следующие **принципы антибиотикотерапии**:

1. Антибиотик должен обладать выраженным специфическим действием на возбудителя с учетом его чувствительности.

2. Препарат следует назначать в установленной терапевтической дозе, соблюдая кратность применения.

3. Способ введения антибиотика в организм должен обеспечить полное всасывание и проникновение его в патологический очаг.

4. Антибиотик должен в необходимой концентрации (количестве) длительно сохраняться в различных тканях или органах.

5. Необходимо стремиться к более раннему применению антибиотика и назначению его до полного выздоровления.

6. Следует отдавать предпочтение комбинированному применению антибиотиков между собой и с другими препаратами.

Тем не менее лечение животного при любой болезни должно быть строго индивидуальным, с учетом характера течения болезни и состояния защитных физиологических функций его организма.

Однообразное длительное применение одних и тех же антибиотиков без соблюдения курса лечения, занижение дозы, применение без учета чувствительности может привести к негативным явлениям.

Для того чтобы антибактериальная терапия была эффективной и рациональной, идеальным является применение антимикробного препарата, наиболее активного в отношении установленного возбудителя. Для этого желательно установить этиологию или, по крайней мере,

знать, какой патоген наиболее вероятен, оценить аллергологический анамнез и причины неэффективности предшествующей (если она проводилась) терапии. Необходимо решить, какие антибактериальные средства предпочтительны, определить дозу и схему применения препарата, а также метод введения (пероральный или парентеральный). Весьма существенна и стоимость предполагаемой терапии.

Развитие собственной фармацевтической промышленности в Республике Беларусь – одна из приоритетных задач в обеспечении лекарственной безопасности страны. Сотрудниками кафедры микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ кандидатом ветеринарных наук, доцентом А. А. Гласкович, кафедры фармакологии и токсикологии кандидатом ветеринарных наук, доцентом В. В. Петровым, кафедры свиноводства и мелкого животноводства УО БГСХА кандидатом сельскохозяйственных наук, доцентом М. А. Гласкович, доктором ветеринарных и биологических наук, профессором РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского» П. А. Красочко, доктором биологических наук, профессором кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Л. Ю. Карпенко, кафедры частного животноводства УО ВГАВМ кандидатом сельскохозяйственных наук, доцентом Е. А. Капитоновой, аспирантами С. А. Гласкович и Аамер Рассам Али Аль-Акаби, компаниями ООО «Белэкотехника» (г. п. Свислочь), ООО «Рубикон» (г. Витебск) на цыплятах-бройлерах были испытаны и апробированы в лабораторных и производственных условиях отечественные антибактериальные препараты:

✓ – перорально с питьевой водой из расчета 0,2 кг препарата на 1 000 л воды в течение 3–5 дней (сохранность – 96,6 %, экономическая эффективность – 3,89 руб. на 1 руб. затрат);

✓ – перорально, растворив 500 см³ препарата в 1 000 л питьевой воды (сохранность – 97,5 %, экономическая эффективность – 2,7 руб. на 1 руб. затрат);

✓ – перорально с питьевой водой из расчета 5 см³ на 2 л воды (по ДВ препарат применяют внутрь в дозе 0,02–0,025 г/кг массы птицы, т. е. 250 см³ препарата на 200 л питьевой воды) в течение 5 дней (сохранность – 98,2 %, экономическая эффективность – 2,69 руб. на 1 руб. затрат);

✓ – перорально с питьевой водой из расчета 0,25 мл препарата на 1 л воды в течение 5 дней (сохранность – 96,0 %, экономическая эффективность – 2,5 руб. на 1 руб. затрат);

- ✓ « – перорально с питьевой водой из расчета 0,5 мл препарата на 1 л воды в течение 5 дней (сохранность птиц – 96,0 %, экономическая эффективность – 3,8 руб. на 1 руб. затрат);
- ✓ – перорально с питьевой водой в дозе 1 мл на 20 кг живой массы в сутки, терапию необходимо продолжать в течение 3–5 дней (сохранность – 97,4 %, экономическая эффективность – 4,68 руб. на 1 руб. затрат);
- ✓ – перорально с питьевой водой из расчета 0,04 г на 1 кг массы птицы (сохранность – 98 %, экономическая эффективность – 4,3 руб. на 1 руб. затрат);
- ✓ – перорально с питьевой водой из расчета 0,25–0,5 кг на 1 т питьевой воды в течение 2–3 дней подряд (сохранность – 98 %, экономическая эффективность – 4,7 руб. на 1 руб. затрат);
- ✓ – перорально с питьевой водой из расчета 800 см³ препарата на 1 000 л воды в течение 5 дней (сохранность птиц – 97 %, экономическая эффективность – 3,8 руб. на 1 руб. затрат);
- ✓ – перорально с питьевой водой в дозе 7 мг/кг живой массы (по ДВ), что составляет 28 см³ (эквивалент 700 мг толтразурила) на 100 кг живой массы в течение 2 дней (сохранность птиц – 96 %, экономическая эффективность – 3,9 руб. на 1 руб. затрат).

Данные антибиотики способствуют снижению заболеваемости, повышению средней живой массы и среднесуточных приростов птицы.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что в ветеринарии является перспективным сочетание антибиотиков, вводимых последовательно в течение курса или в разных курсах. Если на птицефабрике есть устойчивые к антибиотикам микроорганизмы, то только быстрая смена препарата может быть эффективной. Также необходимы и препараты широкого спектра действия, поскольку часто встречаются заболевания ассоциированной этиологии.

В настоящее время ведутся активные работы по изысканию антибиотиков нового поколения, эффективных при лечении вирусных и раковых заболеваний.

1. Определить отношение микроорганизмов к температуре и наличию кислорода.

2. Определить влияние химических факторов на рост и развитие микроорганизмов.

3. Определить влияние биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов (антагонизм между гнилостной и молочнокислой микрофлорой).

4. Определить чувствительность микроорганизмов к различным антибиотикам.

На специальной для данного вида бактерий среде устанавливают минимум, оптимум и максимум температуры для роста и развития микроорганизмов. Для этого засевают в ряд чашек Петри с питательной средой исследуемую культуру микробов. Чашки помещают в термостат для культивирования при различных температурах: 20–25 °С, 25–30, 30–37, 37–43 °С. Ведут наблюдения за интенсивностью роста и развития микробов при различных температурах.

Из спорообразующей культуры готовят обильную суспензию спор в физиологическом растворе. Вносят 1 мл суспензии спор в пробирку с 9 мл физиологического раствора и выдерживают в кипящей водяной бане различное время: 5, 10, 20, 30, 45 мин. Делают посевы на питательные среды из прогретых пробирок. Помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С на 72 ч.

Наблюдают за интенсивностью роста и развития спорообразующих бактерий, определяют устойчивость спор к температуре.

Для определения отношения бактерий к наличию кислорода делают посевы в агаризованную среду с глюкозой. Посевной материал помещают в чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до температуры 40–45 °С агаром. Равномерно распределяют и дают застывать.

Чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч.

Просматривают и анализируют характер роста. Аэробы растут на поверхности и на самом верхнем слое среды. Факультативные анаэробы развиваются по всей среде. Строгие анаэробы – только в глубине среды.

Микроорганизмы проявляют свою жизненную активность в границах определенной кислотности среды.

Делают посевы исследуемой бактериальной культуры на мясо-пептонный агар с различной кислотностью среды (рН): 4; 5; 7; 8; 9. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч. Ведут наблюдения за интенсивностью роста и развития микроорганизмов на средах с различными показателями рН. Определяют оптимальные показатели кислотности среды для исследуемой культуры бактерий.

В стерильные чашки Петри заливают по 12 мл расплавленного мясо-пептонного агара. После застывания среды на ее поверхности с помощью шпателя равномерно засевают исследуемую культуру микроорганизмов. Чашки помещают на 15–20 мин в термостат для подсушивания. Дно чашек маркируют восковым карандашом. Последовательно в чашки с посевами вносят стерильной глазной пипеткой по 1–2 капли раствора щелочи, кислоты, хлорной извести.

Чашки для инкубации микроорганизмов помещают в термостат при температуре 35 °С на 24–48 ч. Определяют влияние химических веществ (растворов щелочи, кислоты и хлорной извести) на рост и развитие микроорганизмов.

Если на изучаемую культуру микробов химическое вещество не действует, то не будут наблюдаться зоны прерывания или задержки роста. Результаты описывают и зарисовывают в тетради.

На мясо-пептонном агаре в чашке Петри бактериологической петлей делают два зигзагообразных посева: один – из пробирки с культурой аммонификаторов, другой – из культуры молочнокислых микроорганизмов. Чашку с посевами помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 72 ч.

Наблюдают за характером роста и отмечают антагонизм между гнилостными и молочнокислыми микроорганизмами. Зарисовывают в тетради.

Исследование проводят с использованием бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков (приготовленных из расчета 1 единица антибиотика в 1 мл раствора). Высушенные диски (диамет-

ром 1 см) хранятся пачками. В стерильную чашку Петри заливают 15–20 мл расплавленного мясо-пептонного агара. После того как среда застынет, на ее поверхность с помощью штапеля равномерно засевают культуру микроорганизма. Чашку помещают в термостат на 15–20 мин для подсушивания. Дно чашки восковым карандашом делят на сектора и маркируют. Стерильным пинцетом в каждый сектор накладывают диски, пропитанные тем или иным антибиотиком.

Чашки с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при температуре 37 °С, после чего производят учет действия антибиотиков по величине зон задержки роста вокруг дисков. Результат описывают и зарисовывают в тетради.

В том случае, если на изучаемый микроорганизм антибиотик не действует, зоны задержки роста не будет. Чем сильнее действие антибиотика на микроорганизм, тем шире будет зона задержки.

1. Влияние физических факторов на микроорганизмы.
2. Влияние химических факторов на рост и развитие микроорганизмов.
3. Взаимоотношение микроорганизмов с другими живыми организмами.
4. Что такое антибиотики? Назовите известные вам антибиотики.
5. Применение антибиотиков в животноводстве.
6. Как определить отношение микроорганизмов к наличию кислорода?
7. Влияние кислотности среды на бактериальные клетки.
8. Отношение микроорганизмов к температуре.
9. Как определить антагонизм между гнилостной и молочнокислой микрофлорой?
10. Объясните методику определения отношения микроорганизмов к рН.
11. Среда обитания микроорганизмов.
12. Метод применения элективных питательных сред.
13. Перечислите требования, предъявляемые к антибиотикам.
14. Классификация микроорганизмов в природе.
15. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

изучить протеолитические, сахаролитические и редуцирующие свойства микроорганизмов.

питательные среды (среда Гисса, среда Эндо; молоко с метиленовым голубым); культура микроорганизмов; бактериологические петли; реактив Несслера; фильтровальная бумага, обработанная раствором уксуснокислого свинца; фильтровальная бумага, обработанная горячим насыщенным (12%-ным) водным раствором щавелевой кислоты; набор красок для окрашивания микроорганизмов; газовые горелки, восковые карандаши, микроскопы, термостат; демонстрационные таблицы.

Изучение биохимических свойств бактерий постоянно дает почву для размышлений исследователям. Несмотря на общность химического состава, бактерии существенно отличаются по биохимическим свойствам – способности расщеплять питательные вещества, антибиотики, продуцировать витамины и ферменты, выделять в процессе жизнедеятельности различные газы. Изучение биохимических свойств бактериальных культур дает возможность разделять их с помощью специальных питательных сред, выяснять видовую принадлежность, разделять на штаммы. Это особенно актуально для молочнокислых бактерий, чистые культуры которых широко применяются в пищевой промышленности.

Для определения вида бактерий, кроме изучения их формы, размеров, подвижности, отношения к окраске по Граму, характера роста на простых питательных средах, большое значение имеет также изучение их биохимических свойств.

Биохимические свойства микроорганизмов – это способность производить расщепление и синтез различных химических веществ с помощью своих же ферментов.

Изучение этих свойств микробов имеет большое значение в технологии некоторых производств (в виноделии, пивоварении, молочной промышленности, микробиологическом синтезе белка, ферментов, витаминов и др.), а также для дифференциации видов микроорганизмов.

Для описания биохимических свойств бактериальных культур используется рабочая классификация по конечным продуктам и результатам работы ферментов. Поскольку ферментный состав клеток молочнокислых и других бактерий зависит от их генома, он является относительно постоянной величиной. Поэтому методы определения активных ферментов позволяют классифицировать колонии и определять их видовую принадлежность. Различают пять групп ферментативной активности бактериальных культур:

- протеолитические;
- сахаролитические;
- окислительно-восстановительные;
- аутолитические;
- патогенные (вирулентные).

Продуктами деятельности бактериальных культур могут являться различные кислоты (например, молочная и масляная кислоты, выделяемые молочнокислыми бактериями), газы (углекислый, водород, сероводород), индол и др.

Современные методы позволяют выделить основные факторы патогенности бактериальных культур. Одним из таких факторов является наличие в бактериальной клетке таких ферментов, как гиалуронидаза, лецитиназа, нейроаминидаза, плазмокоагулаза, и некоторые другие.

Уникальные биохимические свойства некоторых бактериальных ферментов обусловили их широкое применение в биологических исследованиях. Так, например, в медицине широко применяются протеолитические и аутолитические ферменты, а в молекулярной генетике и геномной инженерии – рестриктазы и лигазы, разрезающие и сшивающие цепочки нуклеиновых кислот.

Разложение белковых веществ (протеолиз) выявляют посевом на питательные среды: мясо-пептонный желатин, молоко или свернутую лошадиную сыворотку. Протеолиз проявляется в разжижении желатина.

При росте в молоке микроорганизмы (некоторые виды кокков и палочек), вырабатывающие протеолитические ферменты, через несколько дней вызывают пептонизацию молока (растворение сгустков казеина и просветление).

Протеолиз протекает неодинаково: под действием некоторых видов бактерий образуются конечные продукты распада – индол, сероводород, аммиак. Для обнаружения этих продуктов производят посев изучаемого микроба на мясо-пептонный бульон или пептонную воду и

после 2–3-суточного выдерживания в термостате исследуют с помощью соответствующих реактивов.

определяют путем посева чистой культуры на специальные среды, содержащие различные углеводы (лактозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, маннит и др.) и индикатор (нейтральный красный, лакмус, фуксин основной и др.).

Наиболее распространенной является среда Гисса, которая представляет собой смесь сахара и индикатора в пептонной воде. Для улавливания газа на дно пробирки со средой опускают «газовки» – поплавки для улавливания газа. Образовавшийся в процессе ферментации газ вытесняет часть среды и скапливается вверху «газовки». При этом разложение микроорганизмами того или иного углевода сопровождается цветной реакцией благодаря присутствию индикатора.

В зависимости от вида микроорганизмов сбраживание углеводов происходит с образованием различных продуктов, в основе которых лежат различные виды брожений (спиртовое, уксуснокислое, молочнокислое и др.).

В культуре микробов могут быть обнаружены окислительно-восстановительные ферменты, связанные главным образом с дыхательной функцией микроорганизма.

Как известно, процесс окисления субстрата может происходить посредством присоединения к нему кислорода с участием ферментов оксидаз или в результате отщепления от него водорода с участием ферментов дегидрогеназ. Для этого типа реакции характерно то, что окисление какого-либо одного вещества всегда сопровождается восстановлением (редукцией) другого органического вещества. Первое вещество, от которого отщепляется водород, называют донатором, а то вещество, к которому он присоединяется, – акцептором.

Акцептором водорода чаще всего является кислород воздуха, однако им могут быть также многие органические соединения, способные легко окисляться и восстанавливаться.

С целью выявления ферментов дегидрогеназ и определения их активности в практике микробиологических исследований предложен метод, основанный на введении в питательную среду органической краски, выполняющей роль акцептора водорода. В результате присоединения водорода краситель восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение, называемое лейкобазой. При обильном доступе кислорода оно может вновь окислиться и приобрести прежний цвет.

В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовую настойку, малахитовый зеленый, индигокармин, нейтральный красный и др.

Один и тот же вид микроба ведет себя неодинаково по отношению к краскам разного состава. Это свойство микроба использовано в микробиологической практике в качестве дифференциального признака. Бактерии брюшного тифа редуцируют метиленовый синий, но не редуцируют лакмуса и не изменяют нейтрального красного в противоположность кишечной палочке, которая остается нейтральной в отношении метиленового синего, но восстанавливает лакмус и нейтральный красный.

Трупный аутолиз – это самопереваривание (саморасплавление) тканей протеолитическими ферментами без участия микробов. Впервые термин «аутолиз» был введен в 1899 г. русским ученым Е. Салькавским для обозначения посмертного распада клеток, находящихся в стерильных условиях. С угасанием жизнедеятельности организма и после наступления смерти в течение некоторого времени продолжается выработка ферментов и их активное действие на ткани, которые подвергаются аутолизу. Гидролитические ферменты приводят к развитию процессов переваривания и растворения клеточных групп – аутолизу, развивающемуся неравномерно и неодинаково в органах и тканях.

Выраженность аутолитических изменений зависит от влажности и температуры окружающей среды, прижизненного состояния организма, возраста, пола, особенностей танатогенеза, причины и скорости наступления смерти, кислотно-щелочного равновесия, насыщенности тканей кислородом, ферментами, степени развития подкожно-жирового слоя, гидратации, что необходимо учитывать, определяя давность смерти.

Сроки появления и развития аутолитических процессов в трупе определяются рядом внешних и внутренних условий. К внешним условиям относятся температура и влажность окружающей среды, к внутренним – прижизненное состояние организма, возраст, особенности танатогенеза, причина смерти. Наиболее благоприятной для развития аутолиза является температура 37 °С. Низкая температура задерживает аутолиз, высокая – ускоряет его и способствует гниению. В теплой и влажной среде аутолитические процессы протекают быстрее и развиваются раньше. Отечность тканей и избыточное количество жира ускоряют аутолиз. Гнойно-септические и сердечно-сосудистые заболе-

вания, сопровождающиеся застойными явлениями в органах и тканях, также ускоряют аутолитические процессы.

В коротком агональном периоде аутолитические процессы выражены более резко, чем при продолжительной агонии. Быстрый выброс ферментов в кровь в агональном периоде сопровождается снижением активности одних ферментов вплоть до полного их исчезновения и других – в течение 2 суток и более. Разложение тканей ферментами может происходить уже во время агонии. Слабые кислоты ускоряют, а щелочи тормозят аутолиз. Ткани, обедненные кислородом, снижают сопротивляемость к действию ферментов.

С началом гниения аутолиз прекращается. Морфологические признаки аутолиза весьма разнообразны. Они проявляются набуханием органов и тканей, увеличением их в размерах, дряблостью, тусклостью, пропитыванием кровянистым пигментом, размягчением и разжижением тканей, давая сходство с некоторыми заболеваниями или отравлениями едкими ядами. С первыми проявлениями аутолиза встречаются во время осмотра глаз на месте происшествия.

Роговицы под влиянием аутолиза мутнеют, эритроциты гемолизуются и пропитывают ткани, которые приобретают грязно-красную окраску. В мозге аутолиз начинается очень быстро под действием спинномозговой жидкости, обладающей высокими аутолитическими свойствами. Аутолиз вызывает гемолиз эритроцитов и последующую имбибицию внутренней поверхности сосудов и окружающих тканей. В результате аутолитических процессов внутренние органы под действием ферментов тускнеют, пропитываются окрашенной в красный цвет плазмой крови.

Особенно резко процессы аутолиза бывают выражены в желудочно-кишечном тракте. Под действием желудочного сока, содержащего пепсин, трипсин и другие ферменты, а также процесса разложения пищи слизистая оболочка желудка по ходу сосудов становится бурой, вне их – грязно-красной, легко отделяется от подслизистого слоя, обнажая его. Стенка желудка ослизняется, размягчается и расплывается. В этом случае содержимое желудка может попасть в брюшную полость. Желудочный сок, попавший через отверстие в стенке желудка в брюшную полость, вызывает потускнение брюшины, частичное разрушение капсулы селезенки, размягчение левого купола диафрагмы и его разрушение. От попадания желудочного сока в плевральные полости пристеночная и органная плевра тускнеют, перевариваются и исчезают. Вследствие забрасывания желудочного содержимого в пи-

щевод и попадания его в полость рта, на лицо, в гортань, трахею и крупные бронхи развиваются изменения, напоминающие ожог едким веществом. Слизистая оболочка пищевода, чаще нижнего отдела, становится белесоватой, от прикосновения сползает, обнажая подслизистый слой. Иногда она может исчезнуть. Слизистая оболочка дыхательных путей и полости рта становится грязно-красной, а иногда и бурой, с просвечивающей сетью сосудов. В кишечнике аутолитические процессы приводят к разрушению слизистой оболочки. Вследствие высокой активности протеолитических ферментов аутолитические процессы в поджелудочной железе развиваются ранее, чем в других органах. Она становится грязно-красной, дряблой, частично расплавленной, напоминая картину геморрагического некроза. Для исключения этого заболевания необходимо проведение гистологического исследования. В результате аутолиза мозговое вещество надпочечников быстро распадается. Явлениями аутолиза объясняется и отслойка слизистой мочевого пузыря с наличием в моче хлопьев разрушившейся слизистой оболочки.

Аутолиз является достоверным признаком смерти, позволяет устанавливать давность смерти на месте происшествия с точностью до 6–8 ч, исключить действие деструктивных ядов и болезненных процессов.

Патогенность – это способность микроба определенного вида при соответствующих условиях вызывать характерное для него инфекционное заболевание. Следовательно, патогенность есть видовой признак.

Место проникновения патогенных микроорганизмов в организм называется входными воротами инфекции. В естественных условиях заражение происходит через пищеварительный тракт (алиментарный путь), когда в пищу или в воду попадают патогенные микроорганизмы.

Болезнетворное начало может проникать через поврежденные, а при некоторых инфекционных болезнях (бруцеллез) и неповрежденные слизистые оболочки рта, носа, глаз, мочеполовых путей и кожу.

Источники и пути попадания инфекции. Основным источником и переносчиком заразного начала – больной организм. От больного могут заражаться люди, животные.

Зараженная почва может быть источником заражения. Болезни, при которых заражение происходит в результате попадания патогенных микробов из почвы, получили название почвенных инфекций (сибир-

ская язва, газовая гангрена и др.). Почва может быть источником попадания патогенных микробов в пищевые продукты.

Вода, загрязненная патогенными микробами, также может заражать человека и животных, если ее употребляют необезвреженной.

Возбудитель инфекций передается и через воздух. Такая инфекция называется аэрогенной. Она может быть пылевой и капельной. При пылевой инфекции заражение происходит при вдыхании воздуха вместе с пылью. В пылевой инфекции наибольшую опасность представляют микробы, хорошо переносящие высыхание, например, споры патогенных микробов, а из неспоровых – туберкулезная палочка и гноеродные микроорганизмы. При капельной инфекции мельчайшие капельки мокроты, носовой слизи или слюны могут находиться в воздухе от 4 до 48 ч и из воздуха проникать в организм и вызывать заболевание (грипп, ящур).

Источником инфекции может служить навоз, зараженный патогенными микробами. Многие инфекции передаются через необезвреженное молоко больных животных, через кровососущих членистоногих, когда возбудитель инфекции находится в крови. Молоко может служить причиной заболевания человека. Через него могут передаваться возбудители болезней, как животных, так и человека. Кроме того, молоко может быть причиной распространения эпидемий, когда патогенные бактерии попадают в него от больных или перенесших заболевание людей.

Патогенные микробы, передаваемые через молоко, делят на две основные группы. В первую группу входят микробы, вызывающие заболевания, общие для человека и животных: бруцеллез, туберкулез, сибирская язва, ящур, ку-лихорадка, коли-инфекции; во вторую – микробы, передаваемые от человека к человеку – брюшной тиф, паратифы, бактериальная дизентерия, стрептококковые инфекции, стрептококковый энтерит, холера.

Заболевания могут передаваться человеку через мясную продукцию. Заразные заболевания животных, передающиеся человеку, называются антропоозоозами. Они могут распространяться путем контакта с зараженной тушей, через инфицированное мясо, воду, почву, инфицированную тару и одежду. К ним относятся такие заболевания, как сибирская язва, туберкулез, бруцеллез, ящур, рожа свиней, листериоз, сап, туляремия, ку-лихорадка, лептоспироз и др.

Патогенные микроорганизмы сохраняются на продуктах питания длительное время, если их не обработать специальными средствами.

1. Определить сахаролитические свойства микроорганизмов на средах Гисса.
2. Определить протеолитические свойства микробов (методика определения аммиака, сероводорода, индола и др.).
3. Освоить методику определения редуцирующих свойств микроорганизмов.

Исследуемую культуру микроорганизмов высевают на жидкие среды Гисса. Помещают в термостат при температуре 25–30 °С (для патогенных – 37 °С). Определяют в каждой пробирке происшедшие изменения, указывают на наличие кислотообразования буквой «к», что видно по покраснению среды, и газообразования – буквой «г», в том случае, если поплавков заполнен газом.

Приготавливают препарат-мазок, окрашивают по Граму. Микроскопируют и определяют морфологию микроба. Зарисовывают микроскопическую картину.

Методика определения аммиака. Аммиак в среде с бактериальной культурой определяют с помощью реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры, выращенной на мясо-пептонном бульоне, и каплю реактива Несслера.

При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

Методика определения сероводорода. Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (бумажка закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирку помещают до 3 суток в термостат.

Почернение бумаги происходит при содержании сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый.

Методика определения индола. Определение по методу Морелли осуществляют с помощью полоски фильтровальной бумаги, обработанной горячим насыщенным (12%-ным) водным раствором щавелевой кислоты и высушенной в термостате. Бумагу закрепляют между

пробкой и стенкой пробирки. Пробирку с исследуемой культурой помещают в термостат на 3 суток. Порозовение нижней части индикаторной бумаги указывает на наличие индола.

Производят посев исследуемой культуры микроорганизмов на среду молоко с метиленовым синим. Пробирки с посевами помещают в термостат на 3 суток. Микроорганизмы, образующие ферменты оксидазы и дегидразы, окисляют одни органические вещества в среде и восстанавливают другие. При этом молоко обесцвечивается и приобретает кремовый или белый цвет.

1. Что такое биохимические свойства микроорганизмов?
2. Какие ферменты микроорганизмов вы знаете?
3. Как определяют сахаролитические свойства микроорганизмов?
4. Что такое протеолитические свойства микроорганизмов?
5. Опишите редуцирующие свойства микроорганизмов.
6. Что такое аутолитические свойства микробов?
7. Как проходят процессы аутолиза в желудочно-кишечном тракте?
8. Как производят посев исследуемой культуры микробов на среду молоко с метиленовым синим?
9. Какие патогенные микробы, передаваемые через молоко, вы знаете?
10. Какие заболевания, передаваемые человеку через мясную продукцию, вы знаете?
11. Охарактеризуйте значение и применение биохимических свойств микроорганизмов в бактериологической диагностике и животноводческой практике.
12. Опишите методику определения сероводорода.
13. Сущность методики определения индола.
14. Источники и пути попадания инфекции.
15. Объясните понятие «трупный аутолиз».
16. Перечислите биохимические свойства бактерий.

изучить возбудителей брожения и продукты их жизнедеятельности.

колбы с пробами спиртового, молочнокислого, маслянокислого, уксуснокислого и пектинового брожения; бактериологические петли, предметные стекла, покровные стекла, реактивы для окрашивания микроорганизмов по Граму, раствор йода, этиловый спирт, концентрированная серная кислота, эксикатор, мел, картофель; термостат, микроскоп; демонстрационные таблицы.

Спиртовое брожение представляет собой разложение сахара на этиловый спирт и углекислоту с выделением свободной энергии. Процесс вызывается дрожжевыми грибами, а также некоторыми видами бактерий и муковых плесеней.

Наиболее важное хозяйственное значение имеют дрожжевые грибы, принадлежащие к семейству *Saccharomycetaceae* роду *Saccharomyces*. Различные виды этих дрожжей применяются в кондитерской промышленности, при получении вина, приготовлении различных продуктов.

Для культивирования дрожжей применяют питательные среды, богатые сахарами: солодовое сусло, виноградный сок, МПБ с 1 % глюкозы или синтетические среды, в состав которых входят углеводы. Дрожжи хорошо развиваются в кислой среде (рН 3,0–6,0) при температуре 25–30 °С.

Солодовое сусло. Сусло, полученное на пивоваренном заводе, стерилизуют и оставляют на 3–4 недели. Сусло фильтруют, разбавляют в соотношении 1:2 водопроводной водой, разливают в пробирки, стерилизуют при температуре 100 °С в течение 30 мин.

Дрожжевая вода. К 1 л водопроводной воды добавляют 80 г пресованных или 20 г сухих дрожжей и кипятят смесь в течение 15 мин. Затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам и стерилизуют при температуре 120 °С в течение 20 мин.

Для получения плотной среды к дрожжевой воде добавляют 2 % агар-агара, готовят аналогично, как МПА.

Молочнокислым брожением называют процесс сбраживания молочного сахара (лактозы) с образованием мо-

лочной кислоты. Возбудителями молочнокислого брожения являются две условно разделенные группы микроорганизмов – типичные и нетипичные молочнокислые бактерии. К первым относят молочнокислый стрептококк, болгарскую палочку, ацидофильную палочку и др.; ко вторым – бактерии группы кишечной палочки.

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*) – факультативный анаэроб, неспорообразующий, неподвижный. Располагается короткими цепочками или попарно в виде двух слегка вытянутых диплококков. По Граму окрашивается положительно. Оптимальная температура роста составляет 30–37 °С.

Болгарская палочка (Bac. bugaricum) – крупная, беспоровая, неподвижная. Располагается парами или короткими цепочками. По Граму окрашивается положительно. Оптимальная температура роста – 40–45 °С.

Маслянокислое брожение представляет собой анаэробный процесс разложения углеводов на масляную кислоту и газообразные продукты – водород, углекислоту. Возбудители маслянокислого брожения – строгие анаэробы – представляют собой крупные спорообразующие палочки. Встречаются в загрязненной воде, верхних слоях почвы, навозе, молоке, сыре. К ним относятся *Cl. buturicum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. pectinovorum* и др.

Для культивирования маслянокислых бактерий в лабораторных условиях применяют картофельную среду.

В колбу помещают несколько ломтиков картофеля, 0,5–1 г мела и заливают до $\frac{2}{3}$ объема водопроводной водой. Колбу выдерживают в водяной бане при температуре 80 °С в течение 10 мин. При такой температуре погибают неспоровые формы. Затем колбу со средой помещают в термостат при температуре 37 °С на 2–3 суток.

Мел добавляют в среду для нейтрализации масляной кислоты, которая, накопившись в больших количествах, замедляет процесс брожения.

Чистую культуру маслянокислых бактерий можно получить на МПА с глюкозой в анаэробных условиях.

Для качественного определения масляной кислоты к 4–5 мл перебродившей жидкости добавляют 0,5 мл этилового спирта и 1–2 мл концентрированной серной кислоты. Смесь подогревают. Характерный запах масляноэтилового эфира (ананасный запах) указывает на присутствие в жидкости масляной кислоты.

Уксуснокислое брожение вызывается уксуснокислыми бактериями, которые в процессе дыхания окисляют

этиловый спирт до уксусной кислоты и воды. Изучено несколько видов уксуснокислых бактерий – *Bact. acetici*, *Bact. pasterianum*, *Bact. xylinum* и др. Все они имеют форму палочек, грамтрицательны, спор и капсул не образуют, располагаются цепочками. Уксуснокислые бактерии являются строгими аэробами и всегда развиваются на поверхности сбрасываемой жидкости в виде серовато-белой гладкой или морщинистой пленки.

Один вид уксуснокислых бактерий отличается от другого по внешнему виду пленок и их отношению к окраске йодом. *Bact. pasterianum* образует сухую морщинистую пленку. Если внести кусочек пленки в каплю йода, то пленка синее. *Bact. kutzianum* растет в виде слизистой гладкой пленки, поднимающейся по стенкам колбы, с йодом дает синее окрашивание. Пленка *Bact. acetici* гладкая и слизистая, по стенкам не поднимается, йодом окрашивается в желтый цвет.

Для получения чистой культуры уксуснокислых бактерий их выращивают на дрожжевой воде с 5–7 % спирта или на плотных питательных средах – желатине или агаре, на пивном нехмельном сусле.

За ходом окисления спирта наблюдают, выращивая чистую культуру на среде следующего состава: стерильная вода – 50 мл, этиловый спирт – 2,5 мл, уксусная кислота – 0,5 мл. Нарастание содержания H_3COOH определяют титрованием 0,1 н. раствором едкого натра.

Для качественного определения уксусной кислоты необходимо к 5 мл исследуемой жидкости добавить 0,5 мл этилового спирта и 2–3 мл концентрированной серной кислоты. Смесь подогревают. Запах грушевой эссенции (уксусноэтилового эфира) указывает на присутствие уксусной кислоты.

вызывается анаэробным микроорганизмом *Granulobacter pectinovarum* – крупной, подвижной, споробразующей палочкой. В результате брожения образуются масляная, уксусная кислоты, углекислота и водород. Аэробное брожение пектиновых веществ идет при участии сенной, картофельной палочек и разных видов мукоровых грибов.

В лабораторных условиях пектиновое брожение вызывают следующим образом. Снопик льняной соломы перевязывают в двух местах ниткой, помещают его в колбу, заливают водопроводной водой и кипятят в течение 10 мин для удаления экстрактивных веществ. Затем воду сливают, в колбу наливают свежую водопроводную воду, закрывают пробкой и стерилизуют при температуре 105 °С в течение 15 мин. После того как колба остынет, в нее вносят кусочек свежей льняной

соломы и помещают в термостат при температуре 35 °С. Колбу с пробой можно (но не обязательно) поместить в эксикатор и выкачать воздух. Брожение начинается через 1–2 дня и продолжается в течение 5–6 дней. При этом жидкость мутнеет, а образовавшиеся газы выталкивают соломенный снопок на поверхность. Микроскопически возбудителей пектинового брожения исследуют методом «раздавленной капли», отжав на предметное стекло немного жидкости из сброженной соломки.

Для получения чистой культуры *Granulobacter pectinovarum* берут простерилизованные ломтики картофеля, обсыпают мелом и наносят на них каплю жидкости из сброженной соломки. Бактериологическую чашку с картофелем помещают в эксикатор, выкачивают воздух и ставят в термостат при температуре 35 °С. На поверхности картофеля вырастают колонии бацилл пектинового брожения.

1. Сделать препараты-мазки возбудителей брожения (спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, уксуснокислое и пектиновое), окрасить по Граму, микроскопировать. Зарисовать в тетради.
2. Выделить чистые культуры возбудителей брожения.
3. Провести качественные реакции для определения конечных продуктов жизнедеятельности возбудителей брожения.

Приготовить микроскопические препараты из проб со спиртовым, молочнокислым, маслянокислым, уксуснокислым и пектиновым брожением. Зафиксировать над пламенем горелки. Окрасить сложным методом по Граму. Определить вид возбудителей брожения. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Под контролем преподавателя провести качественные реакции для определения конечных продуктов брожения (уксусной, молочной, масляной кислот).

1. Брожение как анаэробный тип дыхания.
2. Спиртовое брожение: химизм, возбудители, использование.

3. Молочнокислое брожение: возбудители, химизм, применение в животноводстве и промышленности.
4. В чем заключается суть уксуснокислого брожения?
5. Маслянокислое брожение: химизм, возбудители и использование.
6. Пектиновое брожение: химизм, возбудители и использование.
7. Хозяйственное значение дрожжевых грибов.
8. Что такое солодовое сусло? Для чего оно используется?
9. Как определяется вид возбудителей брожения?
10. Как сделать препараты-мазки возбудителей брожения?
11. Как выделяются чистые культуры возбудителей брожения?
12. Что такое конечные продукты жизнедеятельности возбудителей брожения?
13. Опишите уксуснокислые бактерии *Bact. acetici*, *Bact. pasterianum*, *Bact. xylinum*.
14. Для чего используются анаэробные микроорганизмы *Granulobacter pectinovarum*?
15. Какое используется оборудование и материалы для исследования возбудителей брожения?

ознакомиться с правилами взятия материала и пересылкой его для лабораторного исследования, с методами лабораторной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

микроскопы, иммерсионное масло; окрашенные мазки сибирской язвы, мазки с рожистой палочкой, мазки с туберкулезной палочкой, культура кишечной палочки на среде Эндо; предметные стекла, набор реактивов для окрашивания по Граму, горелки, бактериологические петли; демонстрационные таблицы.

– это сложный биологический процесс взаимодействия макроорганизма и возбудителя болезни, происходящий при определенных условиях внешней среды.

В процессе эволюции одни виды микроорганизмов приспособились к паразитированию только в организме млекопитающих, другие – только в организме человека или рыб.

Действие патогенных микробов на организм высокоспецифичное, т. е. каждый вид их вызывает определенный инфекционный процесс. Степень патогенности (вирулентность) у разных штаммов одного и того же вида может быть различной.

Источниками возбудителей инфекций являются:

- 1) зараженный организм (рыба, животное, человек);
- 2) растительные субстраты (солома, сено, фураж, пораженные возбудителями ботулизма, фузариотоксикоза), в которых находятся возбудители инфекционных болезней, выделяющие токсины и вызывающие тяжелые отравления животных;
- 3) навоз. При неправильном хранении и использовании его инфицируются почва, вода, корма.

В водоемах содержится большое количество патогенных микробов, попадающих со сточными водами, при водопое больных животных. В озерах, прудах, сильно загрязненных органическими отбросами, активно размножаются эшерихии, лептоспиры, сальмонеллы.

При диагностике вирусной инфекции устанавливают диагноз, выясняют пути заноса инфекции, определяют факторы, способствующие распространению инфекции среди животных.

Исследуемый материал необходимо отбирать стерильными инструментами в стерильную посуду. Поверхность органа (ткани) на месте разреза следует прижечь шпателем или металлической пластинкой.

Материал берут не позднее 2 ч после гибели животного, особенно в теплое время года.

Материал отправляют в лабораторию в неконсервированном виде в случае его доставки в течение 24 ч. Если это невозможно, материал посылают в замороженном (в термосе со льдом) или консервированном виде. Для консервирования используют 30%-ный водный раствор химически чистого глицерина или стерильное вазелиновое масло. Материал заливают консервирующей жидкостью в соотношении 1:5.

Группы мелких животных (поросят, ягнят, птиц) посылают целиком в непроницаемой таре.

Трубчатые кости посылают целыми, с неповрежденными концами, тщательно очищенными от мышц и сухожилий. Их плотно завертывают в марлю, смоченную дезинфицирующим раствором (5%-ный раствор карболовой кислоты) или же вместо дезраствора применяют поваренную соль.

Части кишечника с наиболее характерными патологическими изменениями, освобожденные от каловых масс и перевязанные с двух концов, посылают в лабораторию в отдельной влагонепроницаемой таре с 30–40%-ным водным раствором глицерина или насыщенным водным раствором поваренной соли. Объем консервирующей жидкости должен превышать объем взятого материала в 5–7 раз.

Фекальные массы для исследования отправляют в стерильных стаканах, банках, пробирках, плотно закрытых пергаментной бумагой. От трупов животных фекалии можно посылать в отрезке не вскрытого кишечника, перевязанного с обоих концов. Фекалии необходимо доставить в лабораторию не позднее 24 ч после их взятия.

Кожу для исследования берут из наиболее пораженных мест (размером 10×10 см) и посылают в стерильной герметически закупоренной посуде.

Кровь, гной, слизь, экссудат, мочу, желчь и другой материал посылают в лабораторию в запаянных пастеровских пипетках или стерильных пробирках, флаконах, хорошо закрытых стерильными резиновыми пробками.

Кровь, гной, выделения из естественных полостей для микроскопического исследования (обнаружения микробов, кровепаразитов, выведения лейкоцитарной формулы) посылают в стерильных пробирках или в виде мазков на предметных стеклах. Стекла предварительно кипятят в течение 10–15 мин в 1–2%-ном растворе соды, промывают чистой водой, насухо вытирают и хранят в растворе спирт-эфира, взятых в соотношении 1:1.

Небольшое количество крови у животных можно получить из мелких кровеносных сосудов уха, у пушных зверей – из лапки (пальца), кончика хвоста, у кур – из гербня или сережек, у уток и гусей – из мякоти ступни конечностей, у мышей – из хвоста.

Для получения большого количества крови ее берут у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, верблюдов, буйволов, яков, оленей из яремной вены; у свиней – из орбитального венозного синуса или из хвоста (отрезание кончика хвоста или пересечение на его вентральной поверхности кровеносных сосудов, хвост обмывают водой с мылом, дезинфицируют, а затем кончик его отрезают ножницами, по окончании взятия крови кончик хвоста обрабатывают йодом, перевязывают или прижигают); у собак – из вены сафена или подкожной вены предплечья; у песцов и лисиц – из плантарной вены; у кроликов – из ушной вены; у морских свинок – из сердца; у птиц – из подкрыльцовой вены;

у белых мышей и крыс – из подмышечного «кармана» или путем декапитации.

Взятие крови производят с соблюдением правил асептики и антисептики.

Кровь желателно брать утром, до кормления животных. Взятую кровь выдерживают около часа при температуре 20–30 °С для свертывания, затем кровь отделяют от стенок пробирки металлической спицей или стеклянной палочкой. Далее кровь помещают в прохладное помещение и отстаивают в течение 10–12 ч для получения сыворотки, которую переносят в другие пробирки. Сыворотку доставляют в лабораторию не позже первых суток. При пересылке на большие расстояния в теплое время года сыворотку консервируют 5%-ным раствором карболовой кислоты из расчета 1–2 капли на 1 мл сыворотки или же борной кислотой – 0,05–0,07 г на одну пробирку. Высылают в лабораторию не менее 2–3 мл сыворотки. На каждой пробе сыворотки указывают вид животного, его инвентарный номер. Пробы направляют с описью в двух экземплярах. Пересылают пробирки с плотно закрытыми резиновыми пробками в вертикальном положении.

Мазки крови делают тонкими, равномерными, достаточной длины. На них делают надпись с указанием номера или клички животного и даты изготовления.

Мазки из тканей, гноя, различных выделений готовят путем распределения материала на предметном стекле с помощью бактериологической петли, стеклянной стерильной палочки или предметного стекла. Плотный или вязкий материал помещают между двумя предметными стеклами, раздавливают его, стекла раздвигают в противоположные стороны по горизонтали и получают два тонких мазка (препараты-двойники). Из плотного материала можно делать препараты-отпечатки. Для этого вырезанный кусочек органа с помощью пинцета прикладывают к поверхности предметного стекла несколько раз, получая несколько тонких отпечатков.

Пунктат из лимфатического узла, синовиальную жидкость из сустава берут путем их пункции с помощью стерильной иглы и шприца. На месте пункции выстригают шерсть, кожу обрабатывают спиртовым раствором йода.

Материал посылают для исследования в лабораторию с нарочным. Материал необходимо завернуть в холст или мешковину, пропитанную дезраствором, и уложить в плотный деревянный или металлический ящик со стружками, мякиной или опилками. Ящик с материалом,

подозрительным на наличие возбудителей особо опасных болезней, пломбируют или опечатывают. При этом оформляют сопроводительный документ, который посылают с нарочным в запечатанном конверте одновременно с материалом. В нем указывают адрес хозяйства, вид исследования, на которое направляется материал, подробно описывают направляемый материал, указывают его количество и количество упаковок с ним, вид, пол, масть и возраст животного, его инвентарный номер или кличку, приводят краткое описание эпизоотической ситуации, дату заболевания, дату вынужденного убоя или падежа, краткое описание клинических признаков и патологоанатомических изменений. В заключении в сопроводительном документе ставится предположительный диагноз, дата, должность и подпись специалиста, отправившего материал.

Патологический материал принимает в лаборатории ответственный работник, который проверяет правильность упаковки и соответствие материала сопроводительному документу. В случае если установлены несоответствия отправленного материала записям в сопроводительном документе или его порча, составляется акт, копию которого направляют ветеринарному врачу, отобравшему материал для исследования.

Для диагностики бактериальных инфекций применяют следующие лабораторные методы:

1. Бактериологическая микроскопия. Из патологического материала готовят мазки. Окрашивают и рассматривают под микроскопом.

2. Бактериологический метод – посев на питательные среды для определения культуральных и биохимических свойств и выделения чистой культуры.

3. Выделение токсинов. Некоторые микроорганизмы способны продуцировать ядовитые вещества – токсины. Различают экзотоксины и эндотоксины.

– это продукты метаболизма микробов, выделяемые в окружающую среду. Являются сильными ядами, обладающими антигенными свойствами и оказывающими специфические действия.

– это яды, прочно связанные с микробными клетками, которые освобождаются лишь при разрушении микробов.

4. Серологический метод. Заключается в проведении реакций, посредством которых в сыворотке крови больных животных выявляют специфические антитела, а в патологическом материале – антигены (РА, РП, РСК и др.).

5. Биологический метод. Сводится к искусственному заражению животных для воспроизведения экспериментальной инфекции и подтверждения предполагаемого диагноза.

Экспериментальное заражение лабораторных животных проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя болезни, испытания патогенности изучаемого микроорганизма, определения эффективности вакцин, иммунных сывороток.

Для диагностики вирусных инфекций применяют следующие лабораторные методы:

1. Заражение куриных эмбрионов.

2. Исследование того патологического материала, в котором вирус оставляет свои следы. Например, бешенство – возбудителем является нейротропный вирус. В лабораторию посылают голову животного, проводят микроскопию мозга на наличие телец Бабеша – Негри. Инфекционный гепатит – возбудителем является вирус из семейства аденовирусов. Проводят исследование печеночных клеток на наличие включений типа Рубарта.

3. Серологический метод.

4. Биологический метод (биопроба).

1. Изучить морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей бактериальных и вирусных инфекций.

2. Микроскопировать готовые препараты-мазки возбудителей инфекционных болезней. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

По таблицам, рисункам познакомиться и изучить основные свойства возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. По мазкам изучить морфологию, особенности строения каждого микроорганизма – возбудителя инфекционной болезни. Зарисовать и сделать необходимые записи в тетради.

1. Что такое инфекция, инфекционный процесс?

2. Какие источники возбудителей бактериальных и вирусных инфекций вы знаете?
3. Перечислите лабораторные методы диагностики бактериальных инфекций.
4. Перечислите лабораторные методы диагностики вирусных инфекций.
5. Что такое экзотоксины и эндотоксины?
6. Для чего проводят экспериментальное заражение лабораторных животных?
7. Как проводят исследования патологического материала?
8. Как диагностируют бактериальную или вирусную инфекцию?
9. Объясните действие патогенных микробов на живой организм.
10. В чем заключается разница между серологическим и биологическим лабораторными методами исследований?
11. Как правильно взять исследуемый материал для лабораторного исследования?
12. Правила взятия крови для лабораторных исследований.
13. Опишите приготовление мазков для лабораторных исследований.
14. Как проводится передача патологических материалов в научно-исследовательскую лабораторию?
15. Оформление сопроводительных документов, актов на патологический материал в лабораторию.

ознакомиться с возбудителями сибирской язвы, туберкулеза и бруцеллеза; изучить их основные биологические свойства; провести микроскопию окрашенных препаратов и зарисовать обнаруженные формы микробов.

рабочее место бактериолога; окрашенные мазки микробов; культура микобактерий на среде Левенштейна – Йенсена, неокрашенные мазки из них для окраски по Цилю – Нильсену; таблицы морфологии и роста возбудителей инфекций на питательных средах.

– острое септическое инфекционное заболевание сельскохозяйственных животных и человека. Оно наблюдается в виде sporadических случаев, энзоотии, реже эпизоотии. Болеют крупный и мелкий рогатый скот и свиньи.

Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis*. Это палочки, соединенные в цепочки. Клетки 4–6 мкм длиной и 1,5 мкм шириной, грамположительные, неподвижные (рис. 22–24).

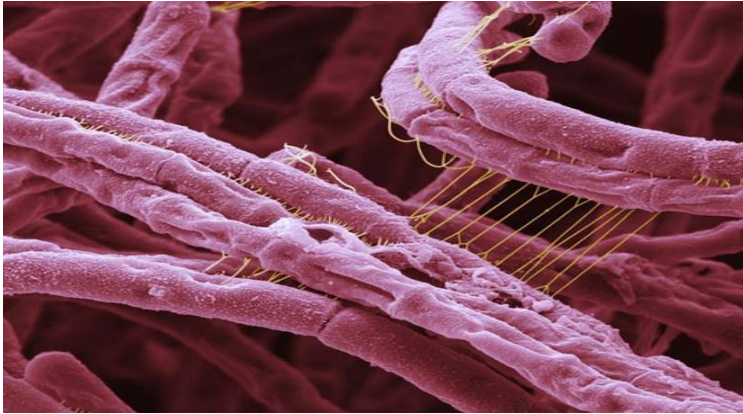


Рис. 22. Возбудитель сибирской язвы – бактерия *Bacillus anthracis* (род *Bacillaceae*)

Бактерия окрашивается по Граму, образует споры и капсулу. Хорошо растет на различных питательных средах. Vegetативные формы быстро погибают без доступа воздуха, при прогревании, а также под воздействием различных дезинфицирующих средств.

Споры сибирской язвы весьма устойчивы во внешней среде, они могут сохраняться в почве до 10 лет и более. Споры образуются вне организма при доступе свободного кислорода. Вирулентность возбудителя обусловлена наличием капсулы и экзотоксина. Помимо пенициллина возбудитель сибирской язвы чувствителен также к антибиотикам тетрациклиновой группы, левомицетину, стрептомицину, неомицину.

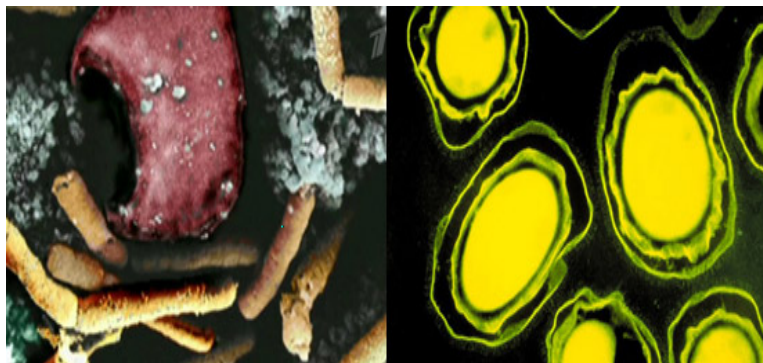


Рис. 23. Слева – возбудитель сибирской язвы – бактерия *Bacillus anthracis* – крупная, неподвижная, с обрубленными концами. Справа – возбудитель сибирской язвы в спорообразном состоянии

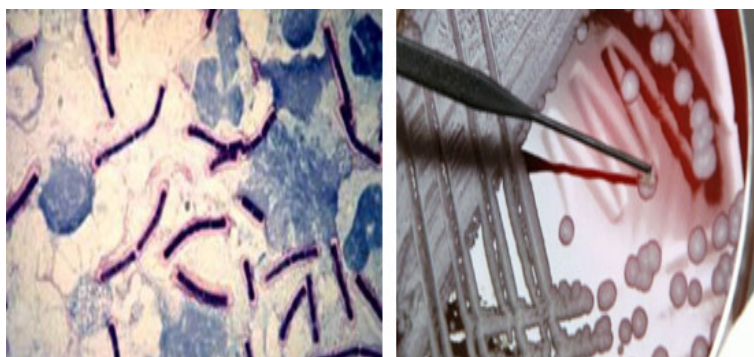


Рис. 24. Возбудитель сибирской язвы: слева – вид под микроскопом, справа – культура возбудителя

Bac. anthracis растет на обычных питательных средах.

На МПБ растет хлопьями, оседающими на дно в виде рыхлого осадка, напоминающего комочек ваты, причем бульон остается прозрачным.

На МПА образует матовые серо-белые (R-форма) колонии, которые при просмотре в микроскопе (малое увеличение) напоминают «голову медузы» (рис. 25).

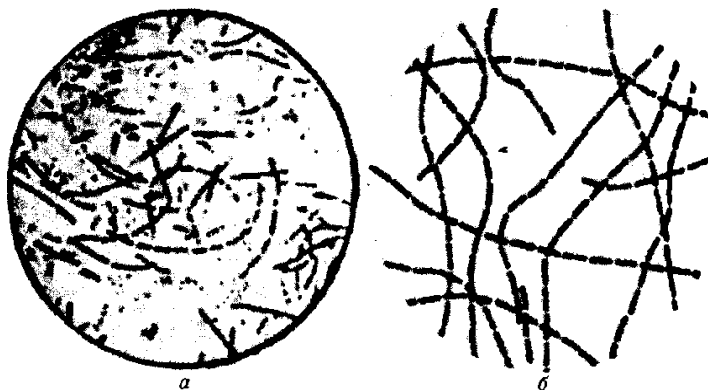


Рис. 25. Возбудитель сибирской язвы: *a*, *б* – мазок из агаровой культуры

В организме и на средах с сывороткой крови *Bac. anthracis* образует капсулы, на обычных питательных средах и в почве при доступе кислорода воздуха – споры (рис. 26).

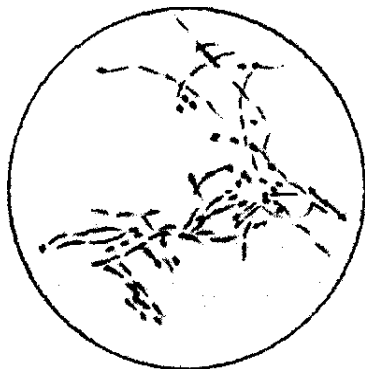


Рис. 26. Споры сибиреязвенных бацилл (окраска по методу Ожешко)

Профилактика заболевания проводится в тесном контакте с ветеринарной службой (рис. 27).



Рис. 27. Специалисты ветеринарной службы при малейших подозрениях на сибирскую язву выезжают на место происшествия и отбирают пробы биологического материала, которые направляются в ветеринарную лабораторию

Мероприятия по эпидемиологическому надзору за сибирской язвой включают в себя:

- выявление контингента с высокой степенью риска заболевания;
- установление времени происшествия;
- выявление и строгий учет неблагополучных населенных пунктов, животноводческих ферм и пастбищ;
- выявление и строгий учет скотомогильников и других мест захоронения больных животных;
- исследование проб грунта при строительстве зданий для детей;
- проведение активного наблюдения и анализ показателей заболеваемости животных и людей;
- проведение работы по обмену информацией между ветеринарными и медицинскими службами.

Мероприятия по ветеринарно-санитарному надзору за сибирской язвой включают в себя:

- выявление и ликвидацию эпизоотических очагов (рис. 28);
- наложение ветеринарного карантина (рис. 29);
- проведение прививок скоту;

- проведение бактериологического исследования скотомогильников, пастбищ и водоемов.



Рис. 28. Туши и шкуры больных животных сжигаются, а территория дезинфицируется



Рис. 29. Объявление карантина в очаге заболевания

Исследования на выявление сибирской язвы осуществляют с использованием микроскопии мазков из исходного патологического материала, высевов на питательные среды, с помощью постановки биопробы и реакции преципитации (РП), а у человека, кроме того, антракциновой пробы.

Основным материалом для исследования служит кровь. Для этого в лабораторию направляют ухо, которое отрезают между двумя лигату-

рами со стороны, на которой лежит труп. Исследуют также почву, фураж, воду, шерсть и кожевенно-меховое сырье. При взятии и пересылке материала необходимо строго соблюдать меры предосторожности, исключающие возможность распространения инфекции.

При подозрении на сибирскую язву вскрытие трупа запрещено. Если же он все-таки вскрыт, то для исследований берут кровь и паренхиматозные органы; от свиней – заглочные лимфатические узлы, участки отечной соединительной ткани. Из патологического материала готовят мазки для выявления капсул и изучения морфологии. Окрашивают одним из методов на обнаружение капсулы (по Ребигеру, Михину, Ольту, Романовскому – Гимзе).

Одновременно с посевом на питательные среды проводят биопробу. Для этого исследуемый материал суспендируют и используют для подкожного заражения белых мышей, морских свинок или кролика. Животные погибают через сутки, реже позже. Результаты подтверждают бактериологическим исследованием.

Выделенные при этом исследовании культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным свойствам и патогенности. Необходимо дифференцировать возбудителя сибирской язвы от почвенных сапрофитных бацилл по следующим основным тестам (табл. 1).

Таблица 1.

Виды	Образование капсул	Подвижность	Гемолитические свойства	Патогенность
<i>Bac. anthracis</i>	+	–	–	+
Непатогенные почвенные бациллы	±	+	+	–

Из серологических методов диагностики используют РП, которую ставят в случаях:

- 1) когда на бактериологическое исследование поступил несвежий материал;
- 2) для исследования кожсырья от животных, убитых без ветеринарного контроля (вне бойни).

В этих случаях выявляется сибирезывенный антиген (преципитиноген) – продукт распада сибирезывенного микроба, находящегося в коже или патологическом материале, который экстрагируется физиоло-

гическим раствором. Реакция ставится с преципитирующей сибирезы-венной сывороткой, содержащей специфические антитела – преципитины.

Лечение осуществляют с помощью антибиотиков в сочетании со специфическими глобулинами или сывороткой.

Профилактику сибирской язвы проводят с использованием вакцины СТИ.

– хроническое заболевание животных и человека, характеризующееся появлением в различных органах специфических морфологических образований – бугорков (туберкулов), обусловленное патогенными видами микобактерий. При этом выделяют следующие виды микобактерий:

- 1) *Mycobacterium tuberculosis* – возбудитель туберкулеза человека;
- 2) *M. bovis* – возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота;
- 3) *M. avium* – возбудитель туберкулеза птиц.

Помимо патогенных существует и группа видов микобактерий, обладающих слабой патогенностью для животных и человека или вовсе не обладающих такими свойствами.

– неподвижные кислото-спирто-щелочеустойчивые палочки, грамположительные, спор и капсул не образуют, длиной от 1,5 до 5 мкм и шириной от 0,3 до 0,5 мкм (рис. 30, 31).



Рис. 30. Микобактерии туберкулеза

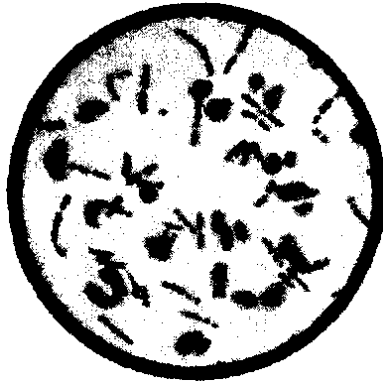


Рис. 31. Микобактерии в мазке, окрашенные по Цилю – Нильсену

– тонкие, нежные, слегка изогнутые палочки, располагаются одиночно и кучками по несколько клеток. Инфекционное заболевание легких – туберкулез – развивается у человека в результате попадания в организм палочки Коха – возбудителя патологии (рис. 32). Обычно микобактерия туберкулеза относится к человеческому типу, однако в редких случаях встречаются микобактерии бычьего и птичьего типов. В человеческом организме патологические бактерии могут сохраняться довольно длительно – от 10 до 30 лет.

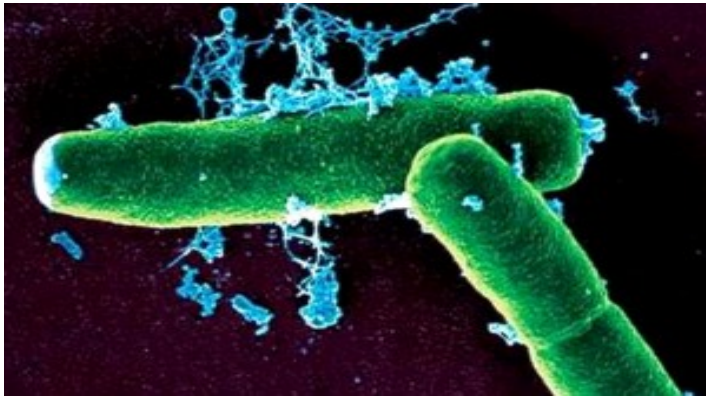


Рис. 32. Воздушно-капельный путь заражения туберкулезом легких

Пути заражения туберкулезом легких: контактный, через органы пищеварения, внутриутробный.

При контактном пути заражения туберкулезом легких инфицирование происходит через оболочку глаз. Развитие патологического процесса может сопровождаться острым конъюнктивитом. В некоторых случаях палочка Коха проникает в здоровый организм через поврежденные кожные покровы. Целостной нормальной кожи она не касается (рис. 33).

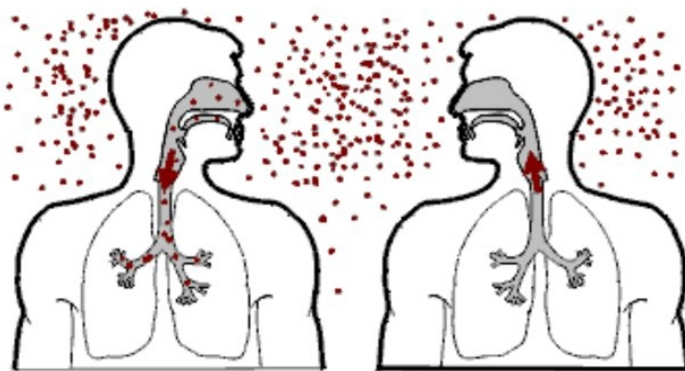


Рис. 33. Способы заражения туберкулезом легких

Для заражения здорового организма *через органы пищеварения* микобактерий туберкулеза понадобится гораздо больше, чем при воздушно-капельном пути. Инфицирование происходит в момент заглатывания больным собственной мокроты, в которой находятся патологические микроорганизмы.

При внутриутробном заражении развивающийся плод инфицируется организмом больной беременной женщины. Этот путь передачи заболевания считается самым редким.

– короткие тонкие палочки, располагаются одиночно и большими скоплениями. Это строгие аэробы, лучше растут при избытке кислорода. На обычных средах (МПА, МПБ) не растут. Культивируются на специальных глицериновых МПА и МПБ, глицериновом картофеле, на различных яичных средах – среде Петраньяни, Левенштейна – Йенсена и др. В первичных выделениях растут медленно на всех средах. Быстрее рост проявляется у микобактерий авиум (10–14 суток), медленнее –

у микобактерий бовис (20–60 суток и более). У микобактерий туберкулеза человеческого вида рост длится 20–30 суток.

На глицериновом бульоне (МПГБ) микобактерии туберкулеза образуют поверхностную массивную складчатую пленку, в среде Петраньяни – сухие, серо-белые бородавчатые колонии; микобактерии бовис образуют на МПГБ тонкую нежную пленку, на среде Петраньяни – сухие бородавчатые колонии; микобактерии авиум на МПГБ образуют мощную слизистую пленку, выпадающую на дно, на среде Петраньяни – сочные, сливающиеся колонии в виде налета.

Вирулентные штаммы микобактерий бычьего и человеческого видов проявляют «феномен» кордообразования, т. е. в конденсационной жидкости твердых и в жидких средах продуцируют корд-фактор, обуславливающий направленное расположение бактерий с образованием скоплений в виде жучков, паучков, веревок (рис. 34).



Рис. 34. Кордообразование у микобактерии

Заражение туберкулезом может происходить в любом возрасте, поэтому первичный туберкулез и формы его проявления можно наблюдать не только у молодняка, но и у взрослых животных.

При алиментарном пути заражения телят раннего возраста туберкулезные очаги первичного комплекса локализируются в кишеч-

нике и в регионарных лимфатических узлах (мезентериальных и портальных).

Первичный комплекс отмечается здесь большей частью неполный – в кишечнике не находят первичного аффекта. Если первичный аффект наличен, то его обнаруживают преимущественно в подвздошной кишке в виде небольшой язвы с творожистым содержимым на дне. Мезентериальные лимфатические узлы увеличены, плотные, нередко обнаруживают картину лучистого казеоза, при котором творожистые массы в виде желтоватых тяжей и полосок располагаются радиально по отношению к хилусу лимфатического узла (рис. 35).

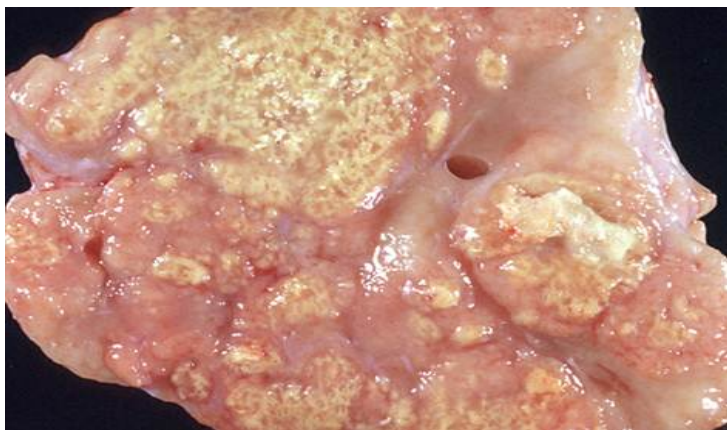


Рис. 35. Туберкулез лимфоузла у быка

Наряду с крупными очагами находят в легких и милиарные туберкулы. Изменения печени, почек и лимфатических узлов такие же, как при остром милиарном туберкулезе. Гистологически обнаруживают сильное поражение бронхиального дерева, особенно респираторных бронхов (рис. 36).

Для диагностики туберкулеза используют комплекс методов: аллергический, патологоанатомический, бактериологический, биологический. Можно дополнительно использовать серологический метод. Для выявления больных туберкулезом животных используют аллергическую пробу туберкулином. Если выделены реагирующие на пробу животные, производят их контрольный убой и патологоанатомическое исследование. В случае обнаружения свойственных туберкулезу изме-

нений дальнейшую работу не проводят и ставят диагноз – туберкулез. Если видимые изменения отсутствуют, проводят дальнейшие исследования: делают посевы на питательные среды, ставят биопробы с исходным патологическим материалом и с выделенной культурой микобактерий.



Рис. 36. Крупноочаговый туберкулез печени у быка

В бактериологической диагностике материалом для исследования служат гной, экссудат, бронхиальная слизь, молоко, кал; посмертно – лимфатические узлы и пораженные органы.

Для микроскопии готовят мазки-отпечатки или мазки-двойники, окрашивают по Граму и по Цилю – Нильсену. При окраске по Цилю – Нильсену на синем или зеленом фоне туберкулезные палочки просматриваются окрашенными в красный цвет. Другая микрофлора окрашивается в синий или зеленый цвет. Этот метод рассчитан на то, что используется термокислотное протравливание, так как туберкулезные палочки трудно поддаются окрашиванию и трудно обесцвечиваются. По Граму они окрашиваются положительно.

Для выделения чистой культуры туберкулеза проводят посев на специальные среды. Перед посевом материал обрабатывают 10%-ным раствором щавелевой кислоты или 15%-ным раствором антиформина или щелочью. Затем растирают в ступке с кварцевым песком или битым стеклом в небольшом количестве физиологического раствора.

Такая обработка способствует уничтожению посторонней микрофлоры.

Биопроба осуществляется заражением морских свинок и кроликов. Суспензию исследуемого материала морским свинкам вводят подкожно в области паха, кроликам – внутривенно в дозе 1–2 мл.

Микобактерии туберкулеза человеческого вида у морских свинок вызывают генерализованный процесс со смертельным исходом (через 2–4 месяца), у кроликов – местный процесс; микобактерии бычьего вида у морских свинок и кроликов вызывают генерализованный процесс со смертельным исходом до истечения 3 месяцев; микобактерии птичьего вида у кроликов вызывают септический процесс с гибелью в течение 8–20 дней, у морских свинок возбудитель не вызывает патологического процесса.

Основным методом дифференциации разных видов туберкулезных микобактерий друг от друга и от атипичных микобактерий является биопроба.

– хроническое инфекционное заболевание животных и человека, протекающее латентно, клинически проявляющееся абортими, у лошадей – тендовагинитами, абсцессами в области холки. Вызывается шестью видами бруцелл:

Br. abortus – возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота;

Br. melitensis – возбудитель бруцеллеза овец, коз;

Br. suis – возбудитель бруцеллеза свиней;

Br. canis – возбудитель бруцеллеза собак;

Br. neotomae – возбудитель бруцеллеза кустарниковых крыс;

Br. ovis – возбудитель инфекционного эпидидимита баранов.

Бруцеллы – мелкие с закругленными концами палочки длиной 0,5–2 мкм, шириной 0,3–0,8 мкм. Располагаются беспорядочно, грамм-отрицательны, спор не образуют, неподвижны. При окрашивании по Козловскому приобретают красный цвет, другие микроорганизмы и фон препарата имеют синий или зеленый цвет, в зависимости от цвета дополнительной краски (рис. 37).

На обычных питательных средах возбудители растут плохо, поэтому для культивирования используют специальные печеночные среды с добавлением глюкозы и глицерина, сыворотки или амниотической жидкости.

На поверхности агара бруцеллы образуют выпуклые, гладкие, блестящие колонии с ровными краями и голубоватым оттенком. В бульоне наблюдается равномерное помутнение, а в дальнейшем об-

разуются небольшой осадок на дне пробирки и пристеночное кольцо. При просмотре культуры в отраженном свете заметен голубоватый оттенок кольца.

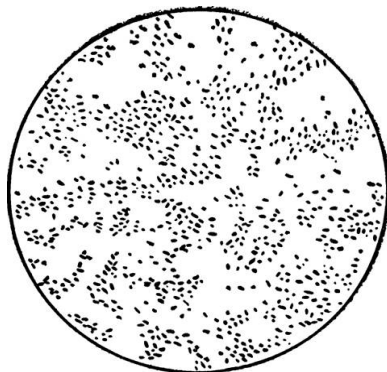


Рис. 37. Бруцеллы

Бруцеллы слабоактивны в биохимическом отношении. Поэтому биохимические тесты, кроме определения сероводорода, не используются.

Бруцеллы хорошо растут на обычных питательных средах в аэробных условиях. Однако у возбудителя аборта коров – *Brucella abortus* – выражены микроаэрофильные свойства: первые генерации этого микроба размножаются исключительно в атмосфере, содержащей 5–10 % углекислоты, и только последующие пересевы дают хороший рост в обычных условиях.

На чашках с агаром вырастают мелкие, как капельки росы, круглые выпуклые колонии, постепенно увеличивающиеся до 2–3 мм в диаметре. Эти колонии имеют обычно гладкое строение (S-форма), мутноватые, с беловатым перламутровым блеском. В процессе диссоциации появляются шероховатые формы (R-формы), которые отличаются от S-формы рядом признаков (табл. 2).

На скошенном агаре вырастают мелкие изолированные колонии, которые в дальнейшем сливаются, образуя серовато-белый полупрозрачный налет. Выращивание на агаре с 5 % глицерина или на печеночной среде улучшает рост бруцелл.

Таблица 2.

Основные признаки	S-формы	R-формы
Рост на агаре	Нежный, влажный	Более грубый и сухой
Вид колоний	Круглые, выпуклые, правильно контурированные, гомогенные или нежно-зернистые	Круглые, менее выпуклые, иногда неправильно контурированные, грубо-зернистые с зеленоватым металлическим оттенком
Рост на бульоне	Гомогенный, без просветления	Хлопчатый, с осадком и просветлением
Взвесь в физиологическом растворе	Суспензия гомогенная, стойкая	Суспензия неравномерная, нестойкая
Термопреципитация суспензии при 90 °С	Отрицательная	Положительная
Агглютиногенность	Очень хорошая	Плохая
Вирулентность	Высокая	Как правило, отсутствует

В бульоне бруцеллы дают общее помутнение с последующим образованием слизистого осадка на дне, желатин не разжижают, молока не свертывают, углеводов не разлагают. Бруцеллы ферментируют белки с образованием аммиака и сероводорода, восстанавливают нитраты в нитриты.

Для диагностики бруцеллеза используются бактериологический, серологический и аллергический методы. Для выявления инфицированных бруцеллами животных используют серологический метод, для бактериологического исследования при жизни служит абортированный плод с плодными оболочками, молоко, содержащее гигром (при бурситах); от убитых с диагностической целью животных – паренхиматозные органы, лимфатические узлы.

При бактериологической диагностике проводят:

- 1) микроскопию препаратов из патологического материала, окрашенных по Граму и Козловскому;
- 2) выделение чистой культуры;
- 3) биологическое исследование (биопробу).

При микроскопическом исследовании для выявления бруцелл используют специальный метод окраски по Козловскому:

- 1) на фиксированный мазок наносят 2%-ный водный раствор сафранина и нагревают до появления паров в течение 2 мин;
- 2) промывают водой;
- 3) дополнительно окрашивают 1%-ным водным раствором малахитовой зелени или метиленовым синим в течение 30 с.

При выделении чистой культуры, с учетом того, что в патологическом материале часто присутствуют посторонние микроорганизмы, посеvy делают и на плотные питательные среды, содержащие генцианвиолет или кристаллвиолет в концентрации 1:200 000 (0,1 мл 0,5%-ного спиртового раствора на 100 мл среды). Эти красители оказывают бактериостатическое действие на разные виды бактерий, кроме бруцелл.

Бруцелла абортус и бруцелла овис в первой генерации требуют повышенного содержания углекислоты. Для получения культуры в первой генерации посеvy выдерживают в термостате в течение месяца, периодически просматривая их. В последующих генерациях рост проявляется через 5–10 суток. Для биопробы используют не менее двух морских свинок, давших отрицательную РА: 0,5 мл взвеси патологического материала вводят подкожно.

Для подтверждения инфицирования бруцеллами через 15–25 и 40 дней исследуют кровь этих животных по РА в разведении 1:5. Затем животных убивают и производят посеvy материала из паренхиматозных органов, лимфатических узлов и костного мозга.

Для диагностики бруцеллеза с сыворотками крови можно ставить РА, РНГА, РСК, РДСК, РБИ и с молоком – КР. Видовую принадлежность выделенной культуры проводят по схеме (табл. 3).

Таблица 3.

Вид бруцелл	Потребность в CO ₂	Образование H ₂ S	Рост на средах		РА с моноспецифическими сыворотками		Чувствительность к фагу «ГБ»
			с фуксинном 1:500 000	с тионином 1:250 000	А	М	
<i>Brucella melitensis</i> (мелитензис)	–	–		–	–	+	–
<i>Brucella abortus</i> (абортус)	+ для первой генерации					–	
<i>Brucella suis</i> (суис)	–		–			–	
<i>Brucella ovis</i> (овис)		–			–	–	–

1. Провести микроскопию демонстрационных препаратов мазков, приготовленных из патологического материала и окрашенных по Михину, Ольту или Романовскому, обнаружить возбудителей сибирской язвы, окруженных капсулой, зарисовать.
2. Провести микроскопию препаратов-мазков, окрашенных по Цилю – Нильсену, обнаружить и зарисовать возбудителей туберкулеза.
3. Изучить и описать характер роста патогенных возбудителей на питательных средах.
4. Провести микроскопию мазков, окрашенных по Козловскому, изучить морфологию возбудителя бруцеллеза и зарисовать.
5. Ознакомиться и записать основные биопрепараты, применяемые при сибирской язве, туберкулезе, бруцеллезе.
6. Изучить схему бактериологического анализа при указанных болезнях.

1. Живая сухая вакцина СТИ против сибирской язвы – представляет собой высушенную под вакуумом однородную пористую массу, состоящую из живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибирской язвы штамма СТИ-1 и наполнителя. Животных вакцинируют однократно подкожно, в дозах в зависимости от возраста: лошадей от 3 до 6 месяцев, от 6 до 12 месяцев и старше года – 0,5, 0,7 и 1 мл соответственно; крупный рогатый скот – 0,5, 0,75 и 1,5 мл; овец – 0,2, 0,3 и 0,3 мл; свиней – 0,3, 0,75 и 1 мл; коз – 0,1, 0,2 и 0,2 мл соответственно.

2. Живая сухая вакцина СТИ против сибирской язвы – представляет собой высушенную под вакуумом однородную пористую массу, состоящую из живых спор бескапсульной слабовирулентной культуры сибирской язвы штамма СТИ-1 в 30%-ном нейтральном растворе глицерина. Вакцину применяют так же, как предыдущую.

3. Лиофилизированная споровая вакцина против сибирской язвы из штамма 55 – представляет собой взвесь спор бескапсульной авирулентной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ в стабилизирующей среде.

4. Жидкая живая споровая вакцина против сибирской язвы из штамма 55 – представляет собой взвесь спор бескапсульной авиру-

лентной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ в 30%-ном нейтральном растворе глицерина.

5. Вакцина жидкая концентрированная против сибирской язвы – изготовлена из бескапсульной авирулентной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ.

6. Жидкая ассоциированная живая вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула – представляет собой смесь живой культуры сибиреязвенного штамма СТИ-1 и сорбированной на геле гидрата окиси алюминия живой концентрированной культуры вакцинного штамма возбудителя эмкара 2/14.

7. Сухая вакцина ГНКИ против сибирской язвы – используется в тех же дозах, в которых используется живая вакцина СТИ.

1. Гипериммунная противосибиреязвенная сыворотка. Сыворотку вводят животным подкожно с лечебной и профилактической целью. Лечебная доза для лошадей и крупного рогатого скота – 100–200 мл, профилактическая – 15–20 мл; лечебная доза для овец, коз, телят и свиней – 50–100 мл, профилактическая – 8–10 мл.

2. Сибиреязвенный гамма-глобулин. Вводят животным подкожно, лошадям и крупному рогатому скоту с лечебной целью в дозе 40–80 мл, с профилактической – 6–7,5 мл; овцам, козам, телятам и свиньям – соответственно 20–40 и 3–4 мл.

1. Сибиреязвенный диагностический аллерген – предназначен для диагностики сибирской язвы сельскохозяйственных животных, а также оценки противосибиреязвенного иммунитета у овец, коз и крупного рогатого скота. Аллерген вводят внутрикожно в дозе 0,2 мл.

2. Преципитированная сибиреязвенная сыворотка – используется для определения специфического возбудителя в исследуемом материале.

3. Стандартный сибиреязвенный антиген – используют для контроля активности преципитирующей сыворотки.

4. Флюоресцирующая сыворотка ОКВС – применяется при иммунофлюоресцентном методе исследования, выпускается в двух видах:

а) адсорбированная – для ускоренного обнаружения некапсульных бацилл;

б) неадсорбированная – для быстрого выявления бацилл в посевах и патологическом материале с последующей дифференциацией бацилл в культурах.

5. Бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ сибирезвенный диагностический – предназначен для идентификации возбудителя сибирской язвы.
6. Сибирезвенный бактериофаг Гамма-МВА.
7. Сибирезвенный бактериофаг К-ВИЭВ.
8. Тест-система для идентификации бациллы методом полимеразной цепной реакции.

Сухая вакцина БЦЖ – используется для специфической профилактики туберкулеза среди молодняка пушных зверей. Вакцину вводят подкожно в дозе 0,02 мл щенкам норок с 20–30-дневного возраста.

1. Туберкулин сухой очищенный (ППД) для млекопитающих – представляет собой стерильный выпаренный до $1/10$ первоначального объема фильтрат убитой культуры возбудителя туберкулеза бычьего или человеческого типа. Используется для аллергической диагностики туберкулеза у крупного и мелкого рогатого скота, пушных зверей, лошадей и других животных. У свиней используется одновременно альт-туберкулин для млекопитающих и туберкулин для птиц. Туберкулинизацию проводят внутрикожно в дозе 0,2 мл; собакам – во внутреннюю поверхность бедра, кошкам – во внутреннюю поверхность уха, норкам – в дозе 0,1 мл интрапальпебрально. Учет реакции осуществляют через 36–48 ч.

2. Туберкулин сухой очищенный (ППД) для птиц – представляет собой стерильный выпаренный до $1/10$ первоначального объема фильтрат убитой культуры возбудителя туберкулеза птичьего типа. Используют для аллергической диагностики туберкулеза у птиц и свиней. Туберкулин вводят птице внутрикожно в дозе 0,1 мл; курам – в бородку, индейкам – в подчелюстную сережку, гусям и уткам – в подчелюстную складку. Учет реакции – через 30–36 ч.

3. Комплексный аллерген из атипичной микобактерии (КАМ) – применяется с целью дифференциации у крупного рогатого скота туберкулиновой реакции от неспецифических реакций, вызванных попаданием в организм атипичных микобактерий (симультанная проба).

4. Очищенный специфический аллерген для выявления крупного рогатого скота, инфицированного возбудителем туберкулеза.

5. Набор для дифференциации микобактерий в реакции иммуноферментного анализа.

6. Тест-система для идентификации микобактерий *M. bovis*, *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции (ПОЛИТУБ).

1. Живая сухая вакцина из слабовирулентного штамма *Br. abortus* 19 против бруцеллеза крупного рогатого скота. Вакцина вводится подкожно, в области средней трети шеи, однократно, в дозе 4 мл.

2. Сухая живая вакцина из слабоагглютиногенного штамма 82 *Br. abortus* против бруцеллеза крупного рогатого скота. Вакцину вводят подкожно, однократно, в дозе 5 мл. Вакцинации подлежат все поголовье крупного рогатого скота с 4–5-месячного возраста. Ревакцинация проводится за 2–3 месяца до осеменения.

3. Вакцина живая сухая из штамма Рев-1 *Br. melitensis* для иммунизации овец и коз против бруцеллеза и баранов против инфекционного эпидидимита, вызываемого *Br. ovis*. Вакцину применяют для профилактической иммунизации маточного поголовья овец и коз в неблагополучных хозяйствах. Молодняк вакцинируют с 3–5-месячного возраста, но не позднее чем за 2 месяца до осеменения. Вакцину вводят подкожно, однократно, в дозе 2 мл. Ревакцинация проводится один раз в 2 года.

1. Единый бруцеллезный антиген для РА, РСК, РДСК – представляет собой взвесь инактивированных нагреванием бруцелл штамма *Br. abortus* 19 в фенолизированном физиологическом растворе.

2. Бруцеллезный антиген для кольцевой реакции с молоком (КР) – представляет собой взвесь слабовирулентного штамма *Br. abortus* 19, инактивированного нагреванием и окрашенного гематоксилином в синий цвет. Применяется с целью проверки молочных стад на бруцеллез и контроля молока на рынках.

3. Бруцеллезный антиген для роз-бенгал пробы (РБП) – представляет собой взвесь в буферном растворе микробных клеток *Br. abortus* штамма 19, инактивированную нагреванием и фенолом, окрашенную бенгальским розовым в малиновый цвет. Предназначен для постановки пластинчатой реакции агглютинации с сывороткой крови при диагностике бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

4. Сыворотка позитивная бруцеллезная для РСК.

5. Бруцеллин ВИЭВ – аллерген, применяется для аллергической диагностики бруцеллеза у сельскохозяйственных животных.

6. Бруцеллоовин – аллерген, предназначенный для аллергической диагностики инфекционного эпидидимита баранов.

1. Латинское название возбудителя сибирской язвы. Укажите, что способствует длительному сохранению во внешней среде возбудителей сибирской язвы.
2. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *Bac. anthracis*.
3. Объясните схему бактериологического исследования.
4. Каковы основные дифференциальные отличия *Bac. anthracis* от почвенных бацилл?
5. С какой целью применяется реакция преципитации?
6. Латинское название возбудителей туберкулеза и заболевания, вызываемого ими.
7. Морфологические, тинкториальные, культуральные свойства возбудителей туберкулеза и патогенность для животных.
8. Схема диагностических исследований на туберкулез.
9. Латинские названия разных видов бруцелл. У каких животных они вызывают заболевание?
10. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства бруцелл.
11. Бактериологический метод диагностики и его особенности.
12. Назовите тесты для индикации видов бруцелл.
13. Какие серологические реакции применяются для диагностики бруцеллеза?
14. Назовите основные клинические проявления бруцеллеза.
15. Назовите особенности химического состава микобактерий туберкулеза, которые повышают их устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды.

ознакомиться с возбудителями пастереллеза, мастита крупного рогатого скота, рожи свиней.

культуры пастерелл, возбудителей маститов крупного рогатого скота и рожи свиней; окрашенные препараты этих микроорганизмов, микроскопы.

(геморрагическая септицемия) – контагиозная инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом и отеками в разных областях тела, а при подостром и хроническом течениях – гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом, иногда энтеритом. Пастереллез у кур называется холерой.

Возбудитель пастереллеза – *Pasteurella multocida*. Роль второго вида пастерелл (*P. haemolytica*) в патологии животных как первичного агента установлена сравнительно недавно. Возбудитель болезни – маленькая палочка с закругленными концами длиной 1–1,5 мкм и шириной 0,25–0,5 мкм; грамтрицательна, спор не образует, неподвижна. В препаратах из органов и крови пастереллы имеют вид овоидов или мелких коккобактерий, для них характерно биполярное окрашивание (рис. 38, 39).

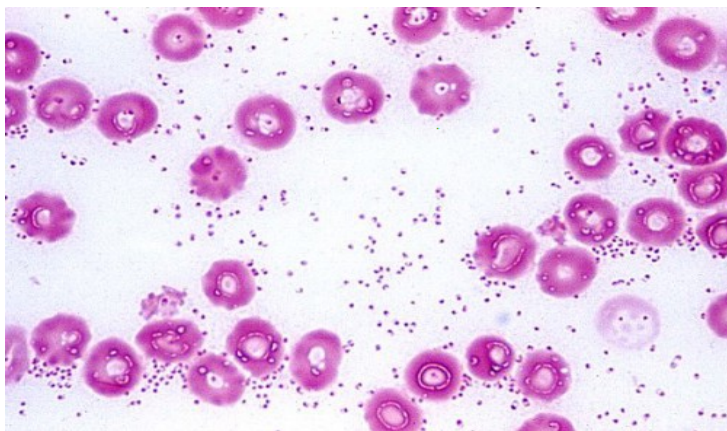


Рис. 38. Пастереллы в крови (окраска по Романовскому – Гимзе)

– факультативные анаэробы. При росте на МПБ дают равномерное помутнение с последующим просветлением и образованием слизистого остатка, при встряхивании поднимающегося в виде косички. На МПА образуют мелкие росинчатые, прозрачные, с ровными краями колонии.

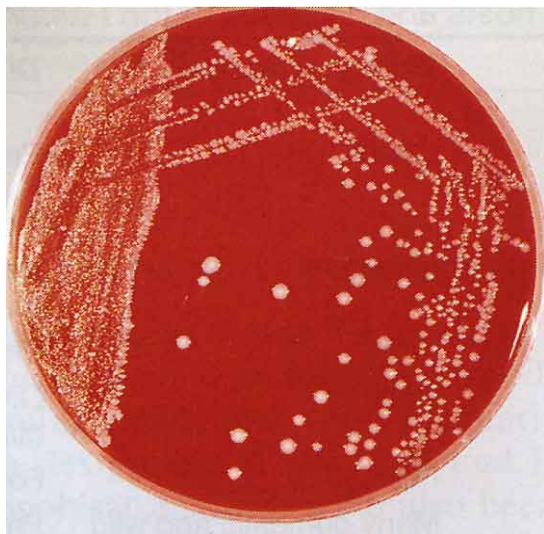


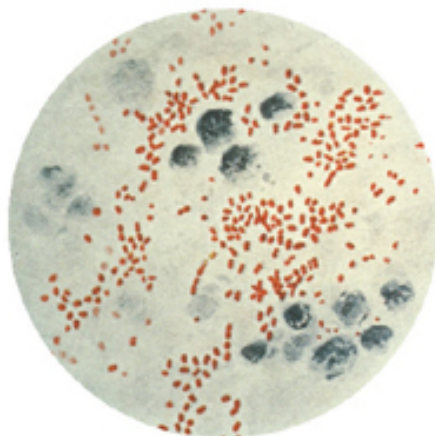
Рис. 39. Культивирование

Ферментируют глюкозу, сахарозу, сорбит с образованием кислоты без газа. Желатин не разжижают, молоко не свертывают, образуют индол.

Материал для исследования: кровь из сердца, экссудат из легких, паренхиматозные органы, трубчатые кости.

Из исходного патологического материала и паренхиматозных органов, взятых у павших после заражения лабораторных животных, готовят препараты, высушивают, фиксируют химическим методом, для выявления bipolarности окрашивают по методу Романовского – Гимзы, Муромцева, чаще метиленовой смесью Леффлера, а также по Граму (рис. 40).

При применении биологического метода исследований (биопроба) лабораторных белых мышей заражают суспензией из патологического материала по общепринятой методике, из органов павших животных выделяют чистую культуру. В дополнение можно проводить флюорохромирование препаратов с последующей люминесцентной микроскопией.



CDC

Рис. 40. *Pasteurella multocida* (окраска по Граму)

известны с давних времен и широко распространены во всех странах мира. Стрептококковый мастит коров был описан впервые во Франции в 1884 г. В молочном скотоводстве – это массовая и одна из наиболее экономически значимых болезней, наносящая значительный урон, который обусловлен потерей продуктивности животных, ухудшением качества молока и расходами на лечебно-профилактические мероприятия.

Мастит у коров нередко приводит к тому, что продуктивность животного сильно снижается. При этом далеко не всегда мастит у коровы возникает только во время лактации. Данное заболевание может развиться и во время сухостоя, т. е. в тот период, когда животное отдыхает перед очередным отелом.

– воспаление молочной железы, чаще всего обусловленное патогенными стрептококками – *S. Agalactiae* (*S. mastitidis*), хотя возбудителями его могут быть и другие микроорганизмы (кишечная палочка, стафилококки и др.)

По своей морфологии это кокки, расположенные цепочками. Спор не образуют, неподвижные, грамположительные (рис. 41).

Более требовательны к питательным средам, чем стафилококки. Растут на средах с добавлением глюкозы, сыворотки крови. На кровяном агаре образуют мелкие стекловидные колонии; в жидкой среде – крошковидный осадок без образования мути.

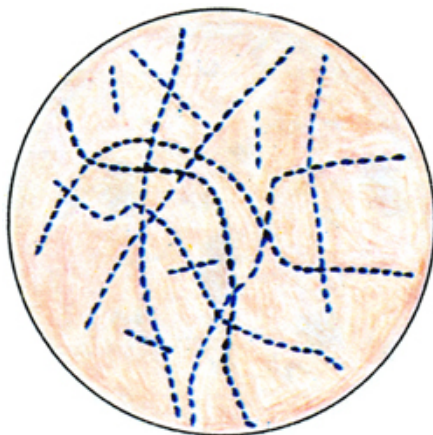


Рис. 41. Маститный (агалактичный) стрептококк

Разлагают до кислоты глюкозу, лактозу, салицин и некоторые другие углеводы, но, в отличие от стафилококков, не ферментируют маннит. Продуцируют экзотоксины и патогенные ферменты: гемолизин, лейкоцидин, некротоксин, летальный токсин, эритротоксин, фибринолизин, гиалуронидазу, ДНКазу, РНКазу.

Основной метод диагностики – бактериологический, материал для исследования – измененный секрет из пораженной доли вымени. Его берут из каждого соска в отдельности в стерильные пробирки.

При микроскопии мазков, окрашенных по Граму, стрептококк располагается длинными цепочками из сплюснутых кокков (в виде частого кольца). Диаметр кокков равен 0,5–1 мкм. Грамположительные. При окрашивании мазка по Романовскому – Гимзе обнаруживают увеличенное количество лейкоцитов, свидетельствующее о воспалении молочной железы.

Патогенные стрептококки биохимически малоактивные. Диагностическим показателем для агалактичного стрептококка является гидролиз гиппурата натрия. Для определения агалактичного стрептококка можно, кроме того, использовать реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле и метод флуоресцирующих антител, применяют для этих целей и КАМП-пробу. Агалактичный стрептококк в этой пробе дает зону гемолиза вблизи от посева стафилококков, в отличие от других видов стрептококков.

– инфекционное заболевание септического характера, протекающее в острой, подострой и хронической формах. Поражает свиней в возрасте 3–12 месяцев (рис. 42, 43). Заболевают и люди.



Рис. 42. Рожа свиней



Рис. 43. Рожа у человека

Возбудитель рожи свиней – *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Это тонкая, нежная палочка, 0,5–1,5 мкм длиной и 0,2–0,3 мкм шириной; располагается одиночно. В старых культурах и при эндокардитах образует нити. Грамположительная, спор и капсул не образует, неподвижная (рис. 44).

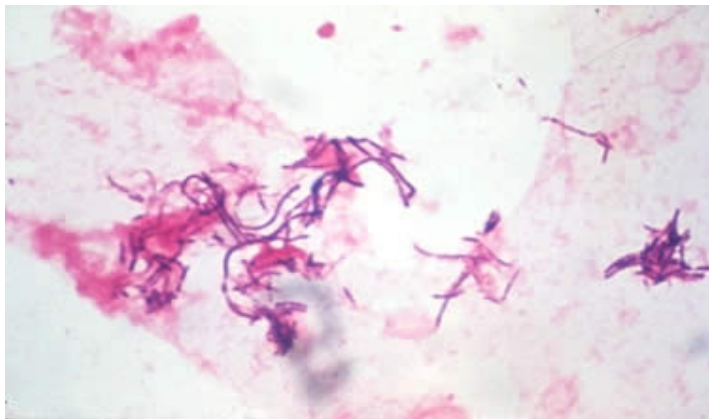


Рис. 44. Образование нитей на клапанах сердца при хронической форме болезни

На МПБ дает нежное помутнение (опалесценцию) и небольшой слизистый осадок, при встряхивании поднимающийся косичкой. На МПА растет в виде очень мелких, росинчатых, бесцветных колоний.

Микроорганизм в биохимическом отношении малоактивен. При посеве на МПА уколком от центрального стержня отходят густые горизонтальные отростки в виде ерша для мытья пробирок. Аэроб, но лучше растет при пониженном содержании кислорода. Материал для исследования – паренхиматозные органы (печень, селезенка, почки), трубчатые кости, кровь из сердца, соскобы с пораженных участков кожи.

Для микроскопии готовят препараты из исходного материала и из чистой культуры. Окрашивают по Граму, микроскопируют в обычном световом микроскопе с использованием иммерсионной системы.

Материал засевают на МПА, МПБ, бульоне Хоттингера при рН 7,4–7,6. Культивируют в аэробных условиях при температуре 36–37 °С. Характерный рост проявляется через 24–48 ч. Полученную чистую культуры пересевают на полужидкий агар, МПЖ, пептонную воду (проба на сероводород), среды с углеводами.

Для биопробы используют голубей и белых мышей, которых заражают суспензией патологического материала (1:5). Мышей заражают подкожно дозой 0,1–0,2 мл, голубей – внутримышечно дозой 0,2–0,3 мл. Мыши погибают через 2–4 суток, голуби – через 2–5 суток. Для выделения чистой культуры трупы павших животных исследуют бактериологически. Полученную культуру идентифицируют серологически в капельной реакции агглютинации со специфической рожистой сывороткой в разведении 1:50. При определении вида возбудителя в патологическом материале можно использовать прямой метод иммунофлуоресценции.

1. Изучить основные биологические свойства возбудителей. Провести микроскопию окрашенных препаратов и зарисовать обнаруженные формы микробов.

2. Изучить биопрепараты для специфической профилактики, лечения и серологической диагностики пастереллеза и рожи свиней.

1. Полужидкая формолгидроокисьалюминиевая вакцина против пастереллеза крупного рогатого скота и буйволов – содержит возбудителей пастереллеза, инактивированных формалином и адсорбированных на гидрате окиси алюминия. Вакцинируются животные внутримышечно, двукратно с интервалом 12–15 дней, в дозах 5 и 10 мл, независимо от возраста.

2. Преципитированная формолвакцина против пастереллеза овец и свиней – содержит вирулентные высокоиммуногенные штаммы пастерелл овец и свиней, обезвреженные формалином и преципитированные алюмокалиевыми квасцами. Вакцинацию проводят животным с 2-месячного возраста, подкожно, двукратно с интервалом 12–15 дней, в следующих дозах: взрослые животные – 5 и 8 мл, молодняк – 3 и 5 мл.

3. Масляная формолвакцина против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов и овец – содержит высокоиммуногенные штаммы пастерелл, инактивированные формальдегидом с использованием ми-

неральных масел в качестве адьюванта. Вакцина вводится однократно, внутримышечно с 3-месячного возраста в дозах: крупному рогатому скоту – 3 мл, овцам – 2 мл.

4. Поливалентная эмульгированная вакцина против пастереллеза свиней – представляет собой концентрированную, инактивированную формалином культуру, заключенную в водно-маслянную эмульсию. Вакцинируют молодняк с 20-дневного возраста внутримышечно, двукратно с интервалом 14–16 дней, в дозах 2 и 3 мл, свиноматок – однократно за 4–5 недель до опороса в дозе 5 мл.

5. Концентрированная поливалентная формолквасцовая вакцина против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят (ППД) – представляет собой смесь одного селекционного штамма сальмонеллы, четырех штаммов пастерелл и четырех штаммов диплококков. Вакцинируют супоросных свиноматок внутримышечно, за 15–40 дней до опороса, однократно, в дозе 4–5 мл, поросят – с 20–30-дневного возраста, двукратно с интервалом 5–7 дней, в следующих дозах: 3–4 мл на первую вакцинацию и 4–5 мл на вторую вакцинацию.

6. Формолвакцина против пастереллеза кроликов – представляет собой взвесь инактивированных формалином культур пастерелл с агаровым адьювантом. Вакцина вводится внутримышечно, двукратно с интервалом 7–10 дней: крольчатам – с 1,5-месячного возраста в дозе 1 и 2 мл, старше 3-месячного возраста – 1,5 и 3 мл.

7. Эмульгированная вакцина против пастереллеза норок – представляет собой инактивированную формалином концентрированную культуру пастерелл норок, заключенную в водно-маслянную эмульсию. Животных вакцинируют с 45-дневного возраста однократно, внутримышечно, в дозе 0,5 мл.

8. Эмульгированная вакцина против пастереллеза нутрий – представляет собой инактивированную формалином концентрированную культуру пастерелл нутрий, заключенную в водно-маслянную эмульсию. Животных вакцинируют в возрасте от 1 до 6 месяцев внутримышечно, однократно, в дозе 0,5 мл, старше 6 месяцев – 1 мл.

9. Сухая авирулентная вакцина против пастереллеза птиц – представляет собой отсепарированную культуру авирулентного штамма П вакцины Пастера. Применяется для вакцинации кур и уток. Вакцину вводят внутримышечно (в грудную мышцу), взрослой птице двукратно с интервалом 10 дней в дозе 0,5 мл, цыплятам в возрасте от 3–5 месяцев первый раз – 0,25 мл, второй – 0,5 мл.

10. Сухая авирулентная вакцина из штаммов АВ и К против пастереллеза птиц (Краснодарского НИВС) – представляет собой выращенную на полужидком агаре культуру авирулентного штамма АВ (1-я вакцина) и слабовирулентного штамма К (2-я вакцина). Вакцинируют уток и гусей с 15-дневного возраста до 2 месяцев вакциной из штамма К в дозе 0,2 мл. Птицу старше 2-месячного возраста иммунизируют двукратно с интервалом 7 дней, в дозе 0,2 мл, первый раз – вакциной из штамма АВ, второй раз – из штамма К.

11. Инактивированная эмульсин-вакцина против пастереллеза птиц.

12. Эмульгированная вакцина против пастереллеза кур. Кур вакцинируют с 3-месячного возраста, уток с 1,5-месячного – однократно, подкожно в верхнюю треть шеи.

13. Эмульсин-вакцина против пастереллеза кур и индеек. Вакцинация проводится однократно, подкожно в среднюю треть шеи: кур – с 2,5-месячного возраста, индеек – с 2-месячного возраста.

14. Эмульсин-вакцина против пастереллеза уток и гусей. Вводится уткам и гусям с 15–20-дневного возраста.

15. Нобилис FC inac. – инактивированная вакцина против птичьей холеры. Представляет собой инактивированный антиген *P. multocida* серопитов 1, 3, 4 и 5. Вакцинируют цыплят-бройлеров с 3-недельного возраста, индюшат и гусят с 6-недельного возраста, двукратно с интервалом 6 недель, подкожно в область нижней части шеи, в дозе 0,5 мл.

16. Формолвакцина против пастереллеза свиней – представляет собой концентрированную и инактивированную формальдегидом культуру пастерелл. Используется для вакцинации свиней с 2-месячного возраста, однократно, внутримышечно, в дозе 3 мл. Свиноматок прививают за 15 дней до случки.

17. Поливалентная формолгидроокисьалюминиевая вакцина против пастереллеза и псевдомоноза норок – представляет собой инактивированную формальдегидом культуру пастерелл и псевдомонад, адсорбированную на гидроокиси алюминия. Вакцинируют норок с 2–3-месячного возраста, однократно, в дозе 1 мл.

18. Бивалентная сапонин-гидроокисьалюминиевая вакцина против пастереллеза и стрептококкоза нутрий – вакцина вводится внутримышечно, двукратно с интервалом 7–10 дней, в дозах 1,5 и 2 мл соответственно.

19. Ассоциированная формолквасцовая вакцина против ботулизма и пастереллеза норок. Вакцинируют норок с 2–3-месячного возраста внутримышечно, однократно, в дозе 1 мл.

1. Сыворотка против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней. Используют с профилактической и лечебной целью, подкожно, в дозе: молодняку – 10–30 мл, взрослым животным – 30–40 мл. Лечебная доза в 2 раза больше профилактической и вводится внутримышечно или внутривенно при появлении первых признаков заболевания.

2. Сыворотка против пастереллеза свиней, кроликов и пушных зверей. Применяют для пассивной иммунизации с профилактической целью двукратно с интервалом 7–10 дней, подкожно, в дозах: взрослым свиньям – 30–40 мл, пороссятам – 10–30 мл, кроликам – 5–10 мл, пушным зверям – 3–5 мл. С лечебной целью сыворотку вводят внутримышечно или внутривенно в двойной дозе.

3. Трехвалентная сыворотка против геморрагической септицемии крупного рогатого скота, овец и свиней. Применяют для пассивной иммунизации с предохранительной целью, подкожно, в следующих дозах: пороссятам-сосунам, телятам, ягнятам – 10–20 мл, свиньям массой 25–50 кг – 20–30 мл, взрослым животным – 30–40 мл. Лечебная доза – двойная.

1. Концентрированная гидроокисьалюминиевая вакцина против рожи свиней – представляет собой инактивированную формальдегидом бульонную культуру нескольких штаммов возбудителя рожи свиней серологического типа В. Вакцинируют свиней двукратно с интервалом 12–14 дней, в следующих дозах: молодняк в возрасте 2–4 месяцев – 3 мл, от 4 месяцев и старше – 5 мл. Ревакцинация проводится через 4–5 месяцев в дозе 5 мл, однократно.

2. Депонированная вакцина против рожи свиней – представляет собой бульонную культуру матрикса Конева с добавлением 4%-ной взвеси гидрата окиси алюминия до 40 %. Вакцинируют свиней с 2-месячного возраста, внутримышечно, двукратно с интервалом 12–14 дней в дозах 0,3–0,5 мл.

3. Сухая живая вакцина против рожи свиней из штамма ВР₂ – представляет собой лиофильно высушенную культуру штамма ВР₂ рожи свиней. Вакцину применяют внутримышечно или перорально с

2,5 месяцев: при внутримышечной вакцинации вакцину вводят двукратно с интервалом 25–30 дней в дозе 1 мл. Ревакцинация проводится через 5 месяцев в той же дозе.

4. Эмульгированная вакцина против рожи свиней – представляет собой инактивированную формальдегидом культуру производственных штаммов серологического типа 2а, заключенную в сложный адъювант. Вакцина применяется внутримышечно, однократно, в дозах: пороссятам в возрасте 2–4 месяцев – 1 мл, пороссятам от 4 месяцев и старше, а также взрослым свиньям – 2 мл. Ревакцинация проводится через 6 месяцев в дозе 2 мл.

5. Вакцина сухая живая против рожи свиней – представляет собой мелкопористую массу в виде таблетки бело-желтого цвета, легко растворимую в физиологическом растворе. Вакцину применяют для предохранительных прививок клинически здоровых свиней в возрасте старше 2 месяцев, свиноматок – не позднее 15–20 дней до случки. Вакцину вводят внутримышечно, в области шеи или внутренней поверхности бедра: первично – в дозе 1 мл, повторно – через 1–2 месяца в той же дозе. Ревакцинация однократная, через каждые 6 месяцев.

6. Адсорбатформолвакцина против рожи свиней – представляет собой обезвреженную формалином культуру возбудителя рожи, адсорбированную на гидрате окиси алюминия. Вакцину применяют для профилактической и вынужденной вакцинации свиней с 2-месячного возраста и старше, свиноматок вакцинируют не позднее чем за 20–25 дней до случки. Свиней вакцинируют внутримышечно, в области шеи, двукратно с интервалом 12–14 дней, в следующих дозах: молодой в возрасте 2–4 месяцев – по 2 мл; свиней от 4 месяцев и старше – по 3 мл. Ревакцинация проводится через 4–5 месяцев однократно в дозе 5 мл.

Гипериммунная противорожистая сыворотка – представляет собой сыворотку крови свиней, гипериммунизированных десятью штаммами возбудителя рожи свиней серологических типов А и В. С лечебной целью сыворотку применяют в следующих дозах: пороссятам-сосунам – 10 мл, свиньям массой до 50 кг – 50 мл, свиньям массой свыше 50 кг – 75 мл. С профилактической целью сыворотку применяют в дозах соответственно 5, 10 и 20 мл. Пассивный иммунитет сохраняется 14 дней.

Сухие рожистые люминесцирующие сыворотки – представляют собой высушенную лиофильным путем глобулиновую фракцию иммунной сыворотки, к которой химическим путем присоединен флуорохром.

1. Латинское название возбудителя пастереллеза.
2. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *Pasteurella multocida*.
3. Схема бактериологического исследования пастереллеза.
4. Инфекционный мастит коров. Причины заболевания, распространение и экономический ущерб.
5. Опишите метод диагностики инфекционного мастита коров.
6. Схема диагностических исследований рожи свиней.
7. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
8. Каких животных используют для биопробы рожи свиней?
9. Что вы знаете о маститном стрептококке?
10. Как готовят препараты из исходного материала и из чистой культуры для микроскопии?
11. Назовите основные клинические проявления рожи свиней.
12. Укажите, образуют ли споры и капсулы возбудители рожи свиней и пастереллеза.

ознакомиться с морфологическими и культуральными свойствами возбудителей эшерихиозов, сальмонеллезов и пневмонии; усвоить микробиологические методы диагностики этих инфекций.

культуры микроорганизмов на МПА и МПБ, на средах с углеводами (средах Гисса), Эндо, Левина, Вильсона; окрашенные препараты возбудителей указанных инфекций; таблицы возбудителей инфекционных заболеваний, биохимической дифференциации эшерихий и сальмонелл.

(колибактериоз) – острая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных в первые дни жизни, вызываемая *E. coli*. Ее разновидности у поросят вызывают отечную болезнь.

Возбудителем эшерихиоза являются патогенные варианты представителя нормальной микрофлоры кишечника *Escherichia coli* (кишечная палочка). Бактерии не погибают во внешней среде, остаются жизнеспособными в воде, в почве и на предметах обихода около 3 месяцев. Возбудители эшерихиоза отлично переносят высушивание, но погибают при кипячении либо при воздействии на них дезсредствами. Кишечная палочка не только способна сохраняться в продуктах питания, при этом она довольно быстро размножается в них.

Возбудителя болезни впервые выделил и описал Т. Эшерих в 1885 г., в честь которого микроб был назван *Escherichia coli*. Долгое время болезнь была известна под названием «колибактериоз». В настоящее время она носит название «эшерихиоз». Болезнь, широко распространенная повсеместно на земном шаре, служит одной из основных причин заболевания и гибели молодняка сельскохозяйственных животных, в результате чего причиняет большой экономический ущерб.

Профилактика основана на проведении комплекса организационно-хозяйственных, противозооотических, зоотехнических, ветеринарно-санитарных и зоогигиенических мероприятий, направленных на повышение резистентности организма матерей и молодняка, обеспечение гигиены родов, а также предотвращение заражения животных через объекты окружающей среды. Эффективна своевременная вакцинация стельных коров и супоросных свиноматок, пассивная иммунизация новорожденного молодняка специфической иммунной сывороткой и гамма-глобулинами. В качестве профилактических средств в первые часы жизни используют неспецифические глобулины, АБК, ПАБК, ацидофилин.

(паратиф) – острая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных в возрасте 10–40 дней, обусловленная разными видами сальмонелл:

1. *Salmonella enteritidis* – вызывает сальмонеллез телят;
2. *S. dublin* – вызывает сальмонеллез телят;
3. *S. typhimurium* – сальмонелла мышинного тифа, вызывает сальмонеллез у разных животных, в том числе и птиц;
4. *S. choleraesuis* – вызывает сальмонеллез поросят;

5. *S. typhisuis* – вызывает сальмонеллез (тиф) свиней;
6. *S. abortusequi* – вызывает паратифозный аборт лошадей и сальмонеллез жеребят;
7. *S. abortusovis* – вызывает паратифозный аборт у овец и сальмонеллезы ягнят;
8. *S. pullorum-gallinarum* – вызывает пуллороз (белый понос) цыплят, тиф кур.

Возбудители колибактериоза и сальмонеллеза относятся к одному и тому же семейству *Enterobacteriaceae* и имеют много общих признаков.

Все бактерии родов *Escherichia* и *Salmonella* представляют собой небольшие палочки с закругленными концами, от 0,5 до 4 мкм длиной и от 0,3 до 1 мкм шириной (рис. 45).



Рис. 45. Возбудитель колибактериоза

Спор и капсул не образуют, подвижны, за исключением возбудителя пуллороза – тифа кур и отдельных вариантов эшерихия коли. По Граму красятся отрицательно. Факультативные анаэробы, хорошо растут на обычных питательных средах. На МПБ дают обильную муть и сероватый аморфный осадок на дне пробирки. На МПА растут в виде круглых, влажных, серовато-белых гладких колоний.

При бактериологической диагностике колибактериоза материалом для исследования служат: фекалии (прижизненно), паренхиматозные органы, трубчатые кости, брыжеечные лимфоузлы (посмертно), трупы

птиц. Производят микроскопическое исследование мазков, окрашенных по Граму, посев на МПА, МПБ, плотные дифференциальные среды (агары Эндо, Левина, бактоагар Ж). С помощью РА с моноспецифическими сыворотками определяется принадлежность выделенной культуры к определенной серогруппе. Заражают белых мышей.

Материал при исследованиях на сальмонеллез – паренхиматозные органы, кровь, трубчатые кости, брыжеечные лимфоузлы, абортированный плод, прижизненно – фекалии. Выполняют гигроскопическое исследование окрашенных по Граму препаратов; посев на накопительные среды (особенно при посеве фекалий), на МПА, МПБ и жидкие, полужидкие и плотные дифференциальные среды.

Дифференциацию различных видов сальмонелл друг от друга, а также от представителей группы кишечной палочки проводят с помощью ряда специальных сред, в которых содержится тот или иной углевод и определенный индикатор. Из моносахаридов и дисахаридов используют глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу и др.; из полисахаридов – крахмал, гликоген, инсулин; из высших спиртов – глицерин, маннит, дульцит, сорбит, инозит. Благодаря наличию индикатора разложение фиксируется до изменения цвета среды и по газообразованию. Для собирания газа в пробирки с жидкой средой опускают поплавки (небольшие пробирки, перевернутые вверх дном). При применении полужидких сред поплавки не используются, газ задерживается в виде пузырьков. В момент стерилизации текучим паром эти поплавки заполняются средой, которая имеет соломенно-желтый цвет при использовании индикатора бромтимол-бляу и красный, если используется индикатор Андрее. Эти среды называются пестрыми, цветными или дифференциальными, так как при посеве бактерий в них получается пестрая картина. В дифференциальный ряд входят и другие среды – молоко простое и лакмусовое, проба на индол и сероводород, образование ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса – Проскауэра). В зависимости от количества входящих сред различают короткий и длинный цветной ряд. В короткий входят углеводы: глюкоза, сахароза, лактоза и трехатомный спирт маннит, в длинный – все указанные среды.

Для определения родовой принадлежности посев из исследуемого материала или из выделенной культуры делается на плотные дифференциальные среды (МПА) с лактозой и индикатором (среда Эндо, бактоагар Ж, среда Левина и др.). На среде Эндо, содержащей в качестве индикатора фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия, колонии

кишечной палочки, вследствие ферментации лактозы и образования молочной кислоты и альдегида, имеют темно-красный цвет с металлическим блеском, в то время как сальмонеллы, не разлагающие лактозу, образуют бледно-розовые колонии. На среде Левина кишечная палочка образует темно-фиолетовые или черные колонии, а сальмонеллы – прозрачные колонии, иногда с фиолетовым оттенком. Дальнейшая групповая дифференциация проводится на средах короткого пестрого ряда.

При посеве на короткий пестрый ряд наблюдается следующая картина (табл. 4).

Таблица 4.

Группа бактерий	Пестрый ряд			
	глюкоза	лактоза	сахароза	маннит
Кишечная палочка	к, г	к, г	–	к, г
Сальмонелла	к, г	–	–	к, г

Примечание. Ферментация углевода с образованием кислоты и газа обозначается буквами «к, г», только кислоты – буквой «к».

Сахарозу не ферментируют бактерии всех групп, за исключением некоторых штаммов кишечной палочки.

Окончательная дифференциация видов осуществляется на средах длинного цветного ряда. На этих средах кишечная палочка, кроме указанных разновидностей, дает положительную реакцию с метилротом (покраснение), отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра, не растет в нитратно-аммонийной среде, не разлагает адонит, инозит, мочевины. Не разжижает желатин, образует индол, не образует сероводорода, вызывает свертывание молока, лакмусовое молоко свертывается и краснеет.

Для определения вида сальмонелл пользуются специальной таблицей, в которой указывается, какие изменения в длинном цветном ряду вызывает тот или иной представитель этого рода. Биохимическую дифференциацию сальмонелл дополняют серологической. Она основана на различиях антигенной структуры этих бактерий. У сальмонелл антигенная структура представлена соматическим О-антигеном, находящимся в клеточной стенке, и жгутиковым Н-антигеном. О-антиген имеется у всех сальмонеллезных бактерий, а Н-антиген – только у подвижных. По общему О-антигену все бактерии подразделяются на

ряд серологических групп, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита (А, В, С, ...). О-антигены обозначаются арабскими цифрами (1, 2, 3, ...). Н-антиген чаще состоит из двух фаз – специфической, которая дает РА со своими специфическими, монорецепторными Н-агглютинирующими сыворотками, и неспецифической, когда выделенная культура дает РА с Н-агглютинирующими сыворотками других видов сальмонелл. Специфическая фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (а, b, с, ...), а неспецифическая фаза – арабскими цифрами или прописными буквами. Для дифференциации паратифозных (сальмонеллезных) бактерий применяются поливалентные и монорецепторные О- и Н-агглютинирующие сыворотки в двух наборах – № 1 и № 2.

Поливалентная агглютинирующая сыворотка применяется для дифференциации культур рода сальмонелл от других родов энтеробактерий.

Монорецепторные О-агглютинирующие сыворотки применяются для определения серологической группы, а монорецепторные Н-сыворотки – для определения вида – серотипа (серовара). Каждая серогруппа представлена большим количеством серотипов.

Техника постановки РА следующая. На предметное стекло наносят каплю неразведенной сыворотки, затем платиновой бактериологической петлей берут 24-часовую агаровую культуру и вносят в каплю сыворотки, тщательно размешивают. В положительном случае О-агглютинация наступает медленно, с образованием комочков и зерен. Н-агглютинация наступает быстрее, и агглютинат имеет вид крупных, рыхлых комочков или хлопьев. При отрицательной реакции агглютинаген распределяется в сыворотке равномерно, компоненты составляют однородную гомогенную взвесь.

Реакция агглютинации в качестве серологического метода диагностики применяется при паратифозном аборте лошадей и пуллорозе цыплят.

(пневмококковая инфекция, диплококковая септицемия) известен с конца XIX в., когда Плаут в 1877 г. выделил ланцетовидного диплококка из трупов ягнят. В 1895 г. Пельс обнаружил в трупах внезапно павших телят аналогичного возбудителя. Большие экспериментальные работы были проведены в Германии И. Траутвейном в 1956 г. В СССР впервые диплококкоз был установлен С. Н. Вышелесским в 1932 г. в Алма-Атинской области. В дальнейшем это заболевание было обнаружено и в других районах страны.

В 1943 г. К. П. Чепуров разработал и внедрил эффективную вакцину против диплококкоза молодняка. Несколько позднее, в 1956 г., А. Г. Малявин предложил поливалентную вакцину против диплококкоза, паратифа и пастереллеза.

(диплококковая септицемия) – инфекционная болезнь молодняка (телят, ягнят, козлят, поросят, реже жеребят), протекающая в острой форме, сопровождается поражением легких и желудочно-кишечного тракта, вызывается *Streptococcus pneumoniae* (*Dipl. septicum*, *D. lanceolatus*). Это кокки. В мазках, окрашенных по Граму и Романовскому – Гимзе, имеют форму парных кокков, наружные концы слегка ланцетовидно заострены, окрашиваются грамположительно (рис. 46).

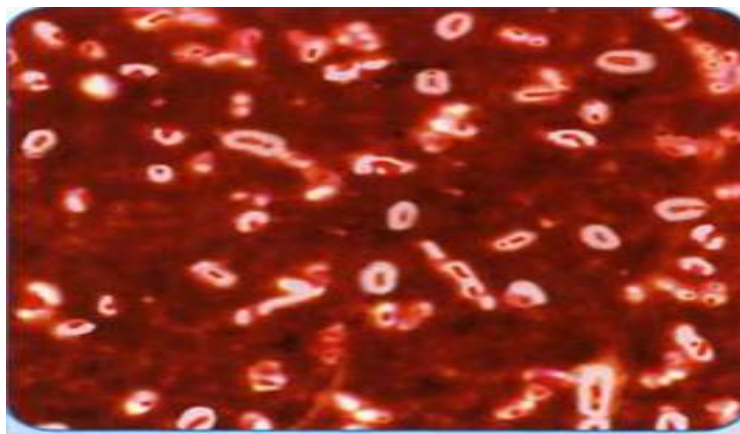


Рис. 46. Мазок из клинического материала капсулы пневмококка контрастируется окружающей тканью, окраска по Граму

В мазках из пораженных тканей хорошо заметна капсула, покрывавшая оба кокка (рис. 47).

Спор не образуют. В культурах капсула не образуется. В мазках из культуры возбудитель часто располагается цепочками. Размер кокков – 0,5–1,5 мкм. Неподвижен. Лучше растет с добавлением сыворотки крови, глюкозы, асцитной жидкости. Может расти в аэробных и анаэробных условиях.

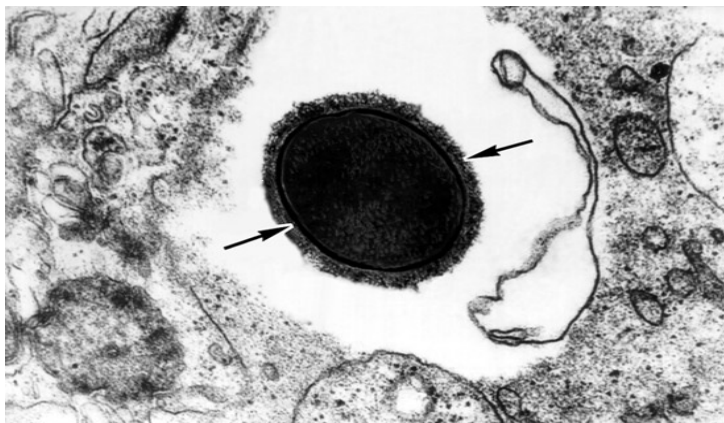


Рис. 47. Пневмококк. Стрелками указана капсула (электронограмма ультратонкого среза)

На плотных средах образует мелкие, прозрачные, гладкие колонии в виде росинок; на жидких – незначительное помутнение и пылевидный осадок. На кровяном агаре развиваются мелкие сочные колонии с зоной гемолиза. Ферментирует глюкозу, лактозу, мальтозу, инсулин. Основными факторами патогенности являются капсула, а также патогенные ферменты и токсины (гиалуронидаза, лейкоцидин, некротоксин).

Материалы для бактериологического исследования: при жизни – выделения больных животных, посмертно – кровь, пораженные участки легких, селезенки, гной или трупы животных. При микроскопическом исследовании мазки из патологического материала окрашивают по Граму и на выявление капсулы.

Посев культур делается на среды с сывороткой и кровью. Выделениями животных или бульонной культурой (рис. 48) заражают лабораторных белых мышей: вводят 0,5 мл внутривентриально. Мыши гибнут на 2–3-й день.

Идентификация культур, выделенных из исследуемого материала и трупов белых мышей, проводится на основании изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств. Основными дифференциальными тестами являются обнаружение капсулы, ферментация инсулина, лизис желчью или солями желчных кислот.

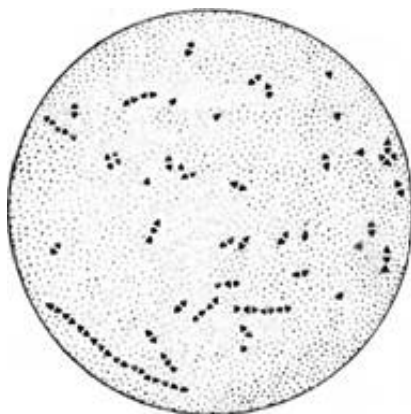


Рис. 48. Пневмококки в чистой культуре с бульона

При постановке бактериологического диагноза решение основывается на выделении чистой культуры возбудителя из патматериала, установлении ее типичных видовых свойств и патогенности для лабораторных животных.

1. Изучить морфологические, культуральных и биохимические свойства возбудителей.
2. Ознакомиться с основами серологической типизации патогенных видов возбудителей.
3. Изучить биопрепараты для специфической профилактики, лечения и серологической диагностики эшерихиоза, сальмонеллеза и пневмококкоза (диплококковой септицемии).

1. Поливалентная гидроокисьалюминиевая формол-тиомерсальная вакцина против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят. Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–15 дней, в следующих дозах: крупный рогатый скот – 10–15 мл первично и 15–20 мл вторично; свиньи – 4–5 и 5–6 мл соответственно;

поросята – 1–1,5 и 1,5–2 мл; овцы – 3–4 и 4–5 мл; ягнята – 1–1,5 и 1,5–2 мл соответственно.

2. Вакцина поливалентная против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей. Вакцинируют подкожно, с внутренней поверхности бедра, двукратно с интервалом 8–10 дней, в следующих дозах: лисицам – 3 и 5 мл; песцам – 2 и 3 мл. Щенков вакцинируют с 30–45-дневного возраста двукратно с интервалом 8–10 дней, в дозах: 1–2 мл – лисицы и 1–1,5 мл – песцы.

3. Вакцина против колибактериоза телят и поросят – представляет собой инактивированные формалином адгезивные пили антигены энтеротоксических колибактерий K88ac, K99, 987P и F41. Вакцина используется для иммунизации стельных коров за 4–6 недель до отела, двукратно с интервалом 10–14 дней. При первой иммунизации доза составляет 15 мл для стельных коров и 10 мл для первотелок, при второй вакцинации – 15 мл. Супоросных свиноматок вакцинируют за 5–6 недель до опороса в дозе 5 мл, двукратно с интервалом 10–14 дней.

4. Коли-Вак K99 – содержит селекционированные штаммы эшерихий, образующие адгезивные антигены и термостабильный энтеротоксин, дополнительно обогащена адгезивным антигеном K99. Вакцину используют для иммунизации стельных коров внутримышечно, двукратно с интервалом 10–15 дней, в следующих дозах: 10–15 мл первично и 15–20 мл вторично; овец – 3–4 и 4–5 мл соответственно; ягнят – 1–1,5 мл и 1,5–2 мл.

5. Коли-Вак K88 – содержит селекционированные штаммы эшерихий, образующие адгезивные антигены, термолabileный и термостабильный энтеротоксины, дополнительно обогащена адгезивным антигеном K88. Вакцину используют для иммунизации супоросных свиноматок и поросят-отъемышей в следующих дозах: свиноматкам – 4–5 мл при первой вакцинации и 5–6 мл при второй иммунизации; поросятам – 1–1,5 и 1,5–2 мл соответственно.

6. Инактивированная вакцина против колибактериоза птиц – содержит взвесь бактерий, инактивированных формалином. Используют в птицеводческих хозяйствах для профилактики колибактериоза кур, индеек, уток. Молодняк вакцинируют аэрозольно в возрасте 1–2, 20–30, 50–60 дней, далее каждые 2,5 месяца. При напольном содержании одновременно с аэрозольной обработкой выпаивают вакцину из расчета 0,1 мл вакцины на голову.

7. Поливалентная вакцина против рота- и короновиральной инфекции и колибактериоза телят. Используется для иммунизации сухостойных коров и первотелок.

8. Поливалентная инактивированная вакцина против трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирусной болезни и колибактериоза поросят. Используется для иммунизации супоросных свиноматок.

9. Ассоциированная вакцина против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей.

10. Инактивированная ассоциированная сорбированная вакцина против колибактериоза и пастереллеза птиц.

11. Нобилис *E. Coli* inac. – вакцина для пассивной иммунизации цыплят-бройлеров против колибактериоза путем иммунизации кур-производителей. Вакцинируют в возрасте 6–12 недель, ревакцинация проводится в возрасте 14–18 недель, подкожно (в области шеи) или внутримышечно (в грудную мышцу) в дозе 0,5 мл.

1. Поливалентная антитоксическая сыворотка против паратифа и колибактериоза телят, ягнят, поросят и птиц. Сыворотку применяют с лечебной и профилактической целью в неблагополучных хозяйствах. Лечебные дозы: для телят – 30–80 мл, для ягнят и поросят – 15–30 мл, для птицы (в зависимости от возраста) – 0,8–1,5 мл. Профилактические дозы в 2–3 раза меньше лечебных.

2. Поливалентная гипериммунная сыворотка против эшерихиоза сельскохозяйственных животных. Используют телятам до 5-дневного возраста в дозе 30–45 мл, старше 5 дней – 50–60 мл, ягнятам – соответственно 15–20 и 20–30 мл, поросятам – 15–20 и 25–35 мл внутримышечно.

3. Бактериофаг против паратифа и колибактериоза телят. Применяют для профилактики кишечных заболеваний у молодняка перорально за 30 мин до кормления.

4. Бактериофаг эшерихиозный.

5. Сыворотка антиадгезивная антитоксическая против эшерихиоза сельскохозяйственных животных. Используется для лечения и профилактики колибактериоза. Сыворотку вводят внутримышечно с лечебной целью телятам в возрасте до 5 дней – 30–45 мл, старше 5 дней – 50–60 мл, поросятам и ягнятам – соответственно 15–20 и 20–30 мл. Профилактически дозы в 3 раза меньше лечебных.

6. Поливалентная сыворотка против сальмонеллеза, колибактериоза, клебсиеллеза, протейных инфекций, а также рота- и короновиральных инфекций рогатого скота.

7. Полифаг – содержит несколько бактериофагов: стафилококковый, эшерихиозный, клебсиеллезный, псевдомонозный и протейный. Используется для профилактики кишечных заболеваний, вызванных указанными возбудителями.

1. Набор типоспецифических агглютинирующих О-копи сывороток. Предназначен для определения серологической принадлежности выделенных эшерихий в РА на стекле и в пробирке.

2. Набор агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам эшерихий K88, K99, 987P, F41, A20. Применяется в РА на стекле для выявления поверхностных адгезивных антигенов у энтеропатогенных штаммов *E. coli*, выделенных от поросят, телят и ягнят.

1. Концентрированная формолквасцовая вакцина против сальмонеллеза (паратифа) телят – представляет собой инактивированную формальдегидом концентрированную культуру сальмонелл. Вакцинируют маточное поголовье крупного рогатого скота внутримышечно, двукратно, за 40–30 дней до отела в дозах 10 и 15 мл, телят – в 1–2-дневном возрасте – двукратно с интервалом 3–5 дней, в дозах 1–1,5 и 1,5–2 мл.

2. Формол-тиомерсальная вакцина против колибактериоза и сальмонеллеза. Вакцинируют и взрослых животных, и молодняк внутримышечно, двукратно с интервалом 7–10 дней.

3. Поливалентная вакцина против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей, птиц, телят и поросят. Вакцинируют молодняк внутримышечно, двукратно с интервалом 7–10 дней, в следующих дозах: пушных зверей с 30–45-дневного возраста – 0,5 и 1 мл; поросят с 1–2 дней жизни – 0,5–1 и 2–3 мл; птицу с первых дней жизни – 0,25–0,5 и 0,5–1 мл. Взрослых животных вакцинируют трехкратно, внутримышечно, за 35–40 дней до отела, в дозах: крупный рогатый скот – 5, 10 и 20 мл; свиней – 5, 8 и 10 мл за 1,5–2 месяца до опороса; взрослую птицу – двукратно, за 1–1,5 месяца до начала яйцекладки, в дозах 0,5, 1–1,5 и 2 мл; пушных зверей – за 15–20 дней до гона, двукратно, в дозах 3 и 5 мл.

4. Концентрированная формолквасцовая вакцина против сальмонеллеза ягнят и овец. Овцам вводят трехкратно, внутримышечно, первично – перед случкой в дозе 5 мл, вторично – за 30–35 дней до окота в дозе 5–8 мл, третий раз – за 15–20 дней до окота в дозе 8–10 мл. Ягнят

вакцинируют с 2-дневного возраста, подкожно или внутримышечно, двукратно с интервалом 5–7 дней, в дозах 2–3 и 4–5 мл.

5. Концентрированная поливалентная формолквасцовая вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят. Вакцинируют поросят с 20–30-дневного возраста внутримышечно, двукратно с интервалом 5–7 дней, в дозах 3–4 и 4–5 мл; свиноматок – за 15–40 дней до опороса, внутримышечно, двукратно, в дозах 5 и 10 мл.

6. Формолвакцина против сальмонеллеза поросят – вакцинируют поросят-сосунов и отъемышей внутримышечно, двукратно с интервалом 5–8 дней, в дозах по 4–5 мл на вакцинацию.

7. Сухая живая вакцина против сальмонеллеза свиней из штамма ТС-177 – вакцинируют поросят с 2-недельного возраста, подкожно, двукратно с интервалом 10–15 дней, в дозах: до 2-недельного возраста – 0,3 и 0,8 мл, от 1 до 4 месяцев – 0,5 и 1 мл, старше 4 месяцев – 1 и 2 мл.

8. Поливалентная вакцина против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей. Вакцину вводят взрослым животным за 2–3 недели до гона подкожно, двукратно с интервалом 8–10 дней, в дозах 3 и 5 мл; молодняку – с 30–45-дневного возраста, двукратно с интервалом 8–10 дней, внутримышечно, в дозах 1 и 2 мл.

9. Вакцина против сальмонеллеза свиней из супрессорного ревертанта *S. choleraesuis* № 9 – представляет собой лиофильно высушенную живую культуру сальмонелл. Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, в дозах 3–5 мл.

10. Вакцина против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма *S. dublin* № 6.

11. Бивалентная вакцина против сальмонеллеза свиней из аттенуированных штаммов *S. choleraesuis* № 9, *S. typhimurium*. Поросят вакцинируют трехкратно, внутримышечно.

12. Сухая живая вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы – используется для иммунизации утят и гусят с 3-дневного возраста, перорально, двукратно, через 2 дня вакцинацию повторяют.

13. Salgen (Салген) lyof. ad us. vet. – аттенуированная вакцина против сальмонеллеза домашних птиц – представляет собой живую, лиофилизированную вакцинную смесь аттенуированных штаммов *S. typhimurium* серогрупп В и D. Используется для иммунизации домашней и водоплавающей птицы, фазанов и голубей. Иммунизация однократная, аэрозольно или с водой.

14. Нобилис (SG 9R) – живая вакцина для иммунизации цыплят яйценосных пород кур. Вакцинируют двукратно, с 6-недельного возраста; ревакцинация проводится с интервалом 12 недель, подкожно в нижнюю часть шеи, в дозе 0,2 мл.

1. Бактериофаг против сальмонеллеза и колибактериоза. Препарат используют как для лечебных, так и для профилактических целей. Задают перорально в дозе 30–50 мл на прием через 2 ч. С профилактической целью препарат задают трехкратно с интервалом 5–7 дней, в дозах 20 мл.

2. Бактериофаг против пуллороза-тифа птиц – применяют перорально за 1–2 ч до кормления в поилках, в дозах: 1–2 мл с лечебной целью молодняку и 5–10 мл взрослой птице; с профилактической целью доза в 2 раза меньше.

3. Антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза и колибактериоза телят, ягнят, овец и птиц. Сыворотку вводят внутримышечно животным в зависимости от возраста: телятам до 10-дневного возраста с лечебной целью – 30–45 мл, с профилактической – 5–10 мл; в возрасте от 10 до 30 дней – соответственно 50–60 и 15–20 мл; старше месячного возраста – 60–80 и 20–30 мл; ягнятам до 2-недельного возраста с лечебной целью – 15–20 мл, с профилактической – 8–10 мл, старше 2-месячного возраста – 20–30 и 10–15 мл соответственно; овцам – 60–100 и 20–30 мл; птице – 0,5–3 мл.

4. Поливалентная антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц – применяют с лечебной и профилактической целью в тех же дозах, в которых применяют вышеописанную сыворотку.

5. Бивалентная антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза и колибактериоза телят – применяют телятам с лечебной и профилактической целью, больным в возрасте до 1 месяца – 40–50 мл, старше 1 месяца – 50–80 мл, профилактическая доза в 2 раза меньше.

6. Сыворотка сальмонеллезная смешанная позитивная – применяется с лечебной и профилактической целью домашней и водоплавающей птице в дозе 5 мл.

1. Сыворотки сальмонеллезные О-комплексные и монорецепторные О- и Н-агглютинирующие для экспресс-идентификации сальмонелл в РА на стекле.

2. Комплексные и групповые сальмонеллезные флуоресцирующие сыворотки (для прямого метода РИФ).

3. Антигены и сыворотки серогрупп В, С и D для диагностики сальмонеллеза в пробирочной реакции агглютинации.

4. Антигены сальмонеллезные моновалентные.

5. Эритроцитарный сальмонеллезный О-диагностикум серогруппы В, содержащий рецепторы 1, 4, 12, для диагностики сальмонеллеза в РНГА.

1. Ассоциированная формолквасцовая вакцина против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят. Представляет собой смесь одного селекционного штамма сальмонеллы, четырех штаммов пастерелл и четырех штаммов диплококков. Вакцинируют супоросных свиноматок за 15–40 дней до опороса однократно, в дозе 4–5 мл; поросят – с 20–30-дневного возраста, внутримышечно, двукратно с интервалом 5–7 дней, в дозах 3–4 мл на первую вакцинацию и 4–5 мл на вторую.

2. Формолвакцина против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят. Представляет собой культуру диплококка, выращенную на полужидком агаре с последующей инактивацией формалином. Вакцинируют молодняк в возрасте от 8 дней до 2–3 месяцев, внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, в дозах: телят – 5 и 10 мл, ягнят и поросят – по 5 мл.

Гипериммунная сыворотка против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят – применяют с лечебной и профилактической целью. Вводят внутримышечно с лечебной целью: телятам – 50–100 мл, поросятам и ягнятам – 10–20 мл. Профилактическая доза в 2 раза меньше лечебной.

1. Латинское название возбудителя сальмонеллеза. Назовите причины заболевания.

2. Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *Escherichia* и *Salmonella*.

3. Схема бактериологического исследования колибактериоза.

4. Схема бактериологического исследования сальмонеллеза.
5. Какие виды сальмонелл вы знаете?
6. Что служит материалом для исследования при бактериологической диагностике колибактериоза и сальмонеллеза?
7. Опишите технику постановки РА.
8. Основы серологической типизации патогенных видов возбудителей колибактериоза, сальмонеллеза и пневмококкоза.
9. Перечислите биопрепараты для специфического лечения и профилактики эшерихиоза.
10. Назовите биопрепараты для специфического лечения и профилактики сальмонеллеза.
11. Перечислите биопрепараты для специфического лечения и профилактики пневмококкоза.
12. Назовите основные клинические проявления пневмонии.
13. Назовите клинические проявления при сальмонеллезе телят.
14. Основы серологической типизации патогенных видов возбудителей.
15. Поливалентная вакцина против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей.
16. Латинское название возбудителя эшерихиоза. Причины заболевания.

ознакомиться с возбудителями ботулизма, столбняка, злокачественного отека, фузариобактериоза, с их биологическими свойствами и методами лабораторной диагностики.

оборудованное рабочее место бактериолога; посевы возбудителей на жидких и плотных питательных средах; рисунки с изображением возбудителей.

– заболевание, с которым человечество официально познакомилось в XVIII в. Именно в 1793 г. в Бюртемберге были документально зафиксированы первые отравления кровяной колбасой и рыбой, погибло 6 человек из 13 пострадавших. Автором современного названия болезни стал бактериолог из Венгрии, извлекий в конце

XIX в. возбудителя инфекции из кишечника умерших пациентов. Изобретение первой иммунной сыворотки против ботулизма принадлежит этому же временному промежутку.

В Беларуси наиболее часто попадание токсина палочки ботулизма в организм человека происходит с консервированными в домашних условиях грибами (85–90 % всех случаев ботулизма). Особенно это касается пластинчатых грибов, которые растут на почве (зеленки, подзеленки, рядовки и др.), из них трудно вымыть песок, в котором могут находиться споры палочки ботулизма. В последующем недостаточная термическая обработка и консервирование, чтобы не «плесневели» сверху, с помощью подсолнечного масла создают оптимальные условия для прорастания спор палочки ботулизма (рис. 49). Попадание токсина ботулизма может также произойти и при употреблении красной рыбы, озерной и речной рыбы домашнего приготовления и консервированного в домашних условиях мяса, окороков и т. д.

– отравление, сопровождающееся параличами глотки, языка и нижней челюсти, обусловленное токсином, который образуется при соответствующих условиях в кормах (силосе, фураже).

При употреблении недоброкачественных продуктов (консервы, рыба, грибы) токсины вызывает тяжелое отравление и у человека.



Рис. 49. *Clostridium botulinum*, окраска генцианом фиолетовым

Токсин образует сапрофитная анаэробная грамположительная подвижная палочка *Clostridium botulinum* длиной 4–6 мкм, шириной 1 мкм, образующая овальные споры, расположенные субтерминально, реже центрально и терминально, и напоминающая теннисную ракетку (рис. 50).

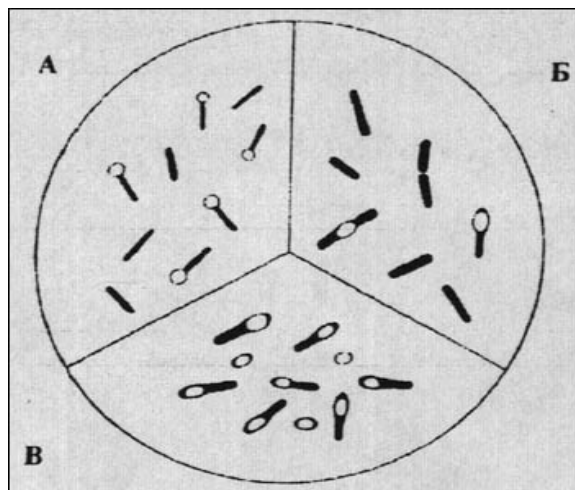


Рис. 50. Клостридии: А – *C. tetani* («барабанные палочки»);
Б – *C. perfringens* (*C. welchii*); В – *C. botulinum* («теннисные ракетки»)

Место обитания бациллы – почва. Споры выдерживают кипячение в течение 6–8 ч. На среде Китта – Тароци образует равномерную муть с газообразованием; на сахарном агаре столбиком – ватообразные компактные колонии; на кровяном сахарном агаре – колонии неправильной формы в виде спутанного клубка ниток с наличием гемолиза; молоко свертывается и пептонизируется; мозговая среда чернеет; разжижает желатин и свернутую сыворотку.

Материал для исследования – подозреваемые в отравлении корма, кровь и моча (прижизненно); содержимое желудка и кишечника, печень, селезенка, слизь (посмертно).

Производят микроскопию и посевы на среды для культивирования анаэробов, но основное внимание направлено на обнаружение токсина и определение его типа (варианта). Различают следующие серологические варианты (серотипы) А, В, С, D, Е и F. Для определения токсина

применяются поливалентные и типоспецифические антитоксические сыворотки.

Биопробу ставят на белых мышах. Им вводят внутривентриально по 0,5–1 мл суспензии исследуемого материала на физрастворе. В качестве контроля одновременно заражают белых мышей смесью исследуемого материала с поливалентной антитоксической сывороткой. Для определения типа токсина ставят реакцию нейтрализации с различными типоспецифическими сыворотками. Исследование проводится также на белых мышах.

– это спорадическая раневая анаэробная токсикоинфекция, обусловленная экзотоксином, продуцируемым *Clostridium tetani*, проявляющаяся тоническими судорогами мускулатуры (рис. 51). Болеют человек и различные виды животных.

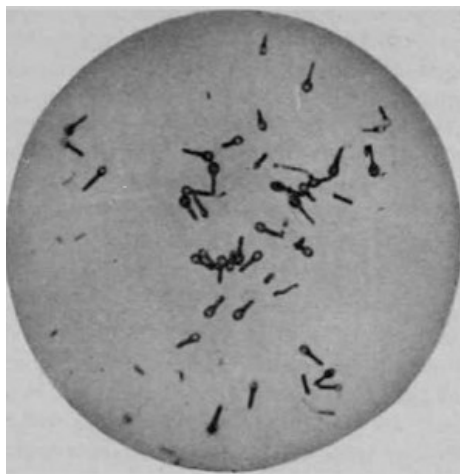


Рис. 51. Возбудитель столбняка – *Clostridium tetani*

Возбудитель столбняка – столбнячная (или барабанная) палочка, тонкая, стройная, 3–6 мкм длиной и до 0,3–0,6 мкм шириной, подвижная. Образует круглую спору на конце клетки, грамположительная. Капсул не образует. Палочки располагаются в мазке беспорядочно, иногда цепочками. Строгий анаэроб, растет при температуре 37 °С. Вызывает слабое помутнение среды Китта – Тароцци. На глюкозо-красном агаре Цейслера растет в виде нежного ажурного налета из

переплетающихся нитей, по ходу которых происходит гемолиз. Отдельные колонии напоминают паучков, а в столбике сахарного агара – чечевичные зерна или пушинки. Молоко свертывается с образованием мелких хлопьев; мозговая среда чернеет.

Материалом для бактериологического исследования служит раневое содержимое из глубоких пораженных тканей. Микроскопия ввиду малого количества палочек не всегда положительна.

Делают посев на среду Китта – Тароцци и через 3–4 дня выросшую смешанную культуру прогревают в течение 20 мин при температуре 80 °С, после чего пересевают на плотные питательные среды с глюкозо-кровяным агаром и на сахарный агар высоким столбиком. Типичный рост и характерные колонии служат основанием для идентификации.

Ввиду исключительной типичности клиники болезни бактериологическое исследование проводят редко. Исследование проводят на обнаружение столбнячного токсина. Испытуемый материал или выделенную на МПБ культуру вводят подкожно белым мышам в дозе 0,3–0,4 мл, в результате наблюдают характерную для столбняка клиническую картину.

– анаэробная инфекция. Это травматическая раневая инфекция, которая проявляется массивным омертвлением тканей и газообразованием в них (газовая гангрена). Возникает у человека и животных при загрязнении раны почвой, содержащей споры токсигенных штаммов клостридий. Поражаются чаще лошади, реже крупный рогатый скот, олени, свиньи. В развитии патологического процесса участвуют: *Clostridium perfringens*, *Cl. oedematiens* (синоним *Cl. novyi*), *Cl. septicum* и *Cl. histolyticum*.

Кроме патогенных анаэробов выделяют непатогенные клостридии. Одновременно с ними в ране обнаруживаются стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, протей и др.

Cl. perfringens – толстая, неподвижная, грамположительная палочка, длиной 2–6 мкм, шириной 1–1,5 мкм (рис. 52). Образует споры и капсулы. На питательных средах развивается быстро. На МКБ дает обильное помутнение с газообразованием; в сахарном агаре столбиком образуются колонии в виде чечевицы; на кровяном сахарном агаре – круглые, крупные колонии с ровным краем и грязно-бурой зоной гемолиза. Молоко свертывает с образованием губчатого сгустка; мозговая среда чернеет.

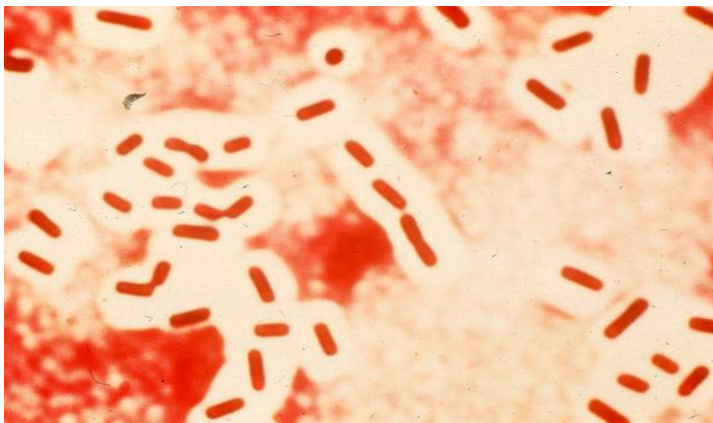


Рис. 52. Грамположительная анаэробная спорообразующая бактерия *Clostridium perfringens*

На среде Вильсона – Блера через 3–4 ч появляются черные колонии и почернение среды. *Cl. perfringens* разлагает с обильным газообразованием глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и другие углеводы, не ферментирует маннит. Разжижает желатин, не разжижает свернутую сыворотку.

Различают шесть типов (вариантов) экзотоксинов: А, В, С, D, Е, F. Тип А является патогенным для человека.

Cl. septicum представляет собой крупную палочку, длиной до 10 мкм, шириной 0,8–1 мкм, подвижная, грамположительная, образует споры. В препаратах-отпечатках с поверхности печени образует нити длиной до 500 мкм, что имеет диагностическое значение. В МПБ через 16–24 ч появляется равномерное помутнение с газообразованием (рис. 53).

В сахарном агаре растет столбиком в виде хлопьевидных колоний; на кровяном агаре появляются колонии в виде сплошной нежной пленки; образует зону гемолиза; молоко свертывает без пептонизации; не вызывает почернение мозговой среды. Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, мальтозу, галактозу, салицин, не разлагает сахарозу и маннит. Разжижает желатин.

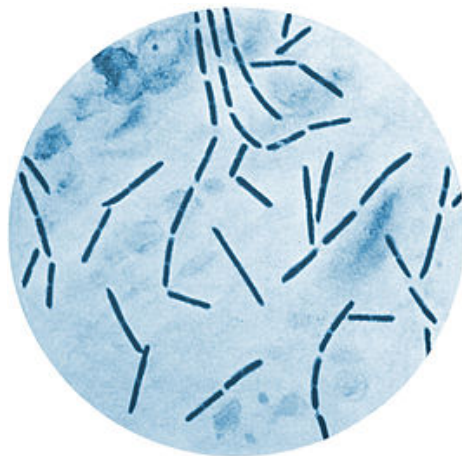


Рис. 53. *Clostridium septicum*

Cl. novyi – крупная, толстая палочка, длиной 5–10 мкм, шириной 1–1,5 мкм. Иногда образует цепочки, капсул не образует, образует споры. Подвижная, грамположительная. На МПБ дает обильное помутнение с газообразованием; на сахарном агаре – колонии в виде спутанного клубка нитей; вызывает гемолиз эритроцитов. Сахаролитические свойства слабо выражены; разлагает глюкозу и лактозу (рис. 54).



Рис. 54. Анаэробная бактерия *Clostridium novyi* – возбудитель газовой гангрены

Cl. histolyticum – сравнительно небольшая, тонкая, с закругленными концами палочка, длиной 3–5 мкм, шириной 0,2–0,5 мкм, подвижная, образует споры, грамположительная. В МПБ растет в виде умеренного помутнения. На полужидком сахарном агаре столбиком образует точечные колонии; на кровяном сахарном агаре в чашках Петри – колонии в виде росинок без гемолиза. Обладает выраженной протеолитической активностью; мозговая среда чернеет; молоко пептонизирует без образования сгустка; желатин и свернутая сыворотка разжижаются. Гликолитические свойства не выражены.

Материалом для бактериологического исследования служат кусочки пораженной мышцы, экссудат, выделения раны. Готовят препараты, окрашивают по Граму, простым методом и на споры. Исследуют на подвижность.

Аэробные посевы делают на обычные питательные среды для выявления сопутствующей микрофлоры. Анаэробными посевами предполагают выделение чистой культуры из спорового материала, учитывая различную устойчивость спор патогенных анаэробов к высокой температуре. Исследуемый материал в виде суспензии на физрастворе перед посевом прогревают в водяной бане при температуре 100 °С в течение 5, 10, 20 и 40 мин. Затем делают высев пастеровской пипеткой в МПБ, в сахарный агар столбиком, на кровяной сахарный агар, в молоко.

Биопробу ставят на морских свинках. Животных суспензией патологического материала заражают внутримышечно или подкожно в области паха. Морские свинки погибают через 16–48 ч. Проводят вскрытие: изучают патологическую картину, делают посевы и препараты, которые окрашивают простым методом и по Граму. Изучают микроскопическую картину.

(некробактериоз) – хроническое заболевание домашних и диких животных, проявляющееся некрозом кожи межкопытной щели и подлежащих тканей, слизистой ротовой полости и пищеварительного тракта.

Возбудитель – полиморфная бактерия *Fusobacterium necrophorum* (палочка Шморля). Окрашивается неравномерно, грамотрицательная, спор и капсул не образует, неподвижная (рис. 55).



Рис. 55. Возбудители некробактериоза: 1 – нити; 2 – палочки

В свежевыделенных культурах отмечаются палочки нитевидной формы. При дальнейших пересевах *Fusobacterium necrophorum* образует короткие палочки и принимает кокковидную форму. Может быть в виде нитей, иногда очень длинных. Обнаруживают возбудителя в патологическом материале. Строгий анаэроб. В МПБ на 3–4-й день дает мелкое хлопчатое помутнение с небольшим газовыделением. Позже образуется ватообразный осадок; в сыровоточном агаре – нежные ватообразные колонии белого или коричневого цвета; на кровяном сахарном агаре растет в виде росинчатых колоний с неровными краями, образуя зеленоватую зону гемолиза; в молоке отмечаются слабые рост и пептонизация; мозговая среда чернеет. Желатин и свернутую сыворотку не разжижает. Образует индол и сероводород. Обладает достаточно выраженной сахаролитической активностью. Ферментирует глюкозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу, галактозу, непостоянно – маннит и глицерин; не разлагает дульцит.

Различают три основные формы некробактериоза:

- конечностей (копытный);
- слизистых и кожи;
- внутренних органов

Наиболее распространенным является копытный некробактериоз крупного рогатого скота (рис. 56). Начинается такой некробактериоз обычно с покраснения межкопытной щели. На следующем этапе болезни появляются кровоточащие гнойные раны, свищи и абсцессы. Животное испытывает крайне неприятные ощущения и придерживает пораженную конечность на весу. Во время осмотра обнаруживается

отечность сустава копытной фаланги. При дальнейшем развитии болезни наблюдается поражение связок, костей и сухожилий. Если процесс принимает злокачественный характер, у животного начинают болеть и вышележащие суставы – вплоть до тазобедренного.



Рис. 56. Копытный некробактериоз крупного рогатого скота

Температура тела у зараженной особи может подниматься до 42 °С. Иногда она также остается и в пределах нормы. Болеют некробактериозом конечностей в основном лишь взрослые коровы и быки. У телят эта форма проявляется крайне редко.

При некробактериозе слизистых и кожи поражения отмечаются чаще всего в области туловища, обычно в задней его части. У молодняка также могут наблюдаться гнойные некрозы слизистых оболочек рта, десен, трахей, языка, носа, гортани, желудочно-кишечного тракта и т. д.

Некробактериоз внутренних органов у крупного рогатого скота проявляется чаще всего абсцессом печени. При этом характерных клинических признаков обычно не наблюдается. Но сами животные, заразившиеся этой формой некробактериоза, чувствуют себя крайне неудовлетворительно – плохо едят, быстро худеют, значительно снижают продуктивность, стонут при попытке встать. При некробактериозе внутренних органов, помимо всего прочего, у коров может сильно повышаться температура тела.

Основным методом диагностики является бактериологический метод. Для исследования после механической очистки пораженного уча-

стка берут ткань на границе больной и здоровой, отделяемое некротических язв, свищевых ходов; посмертно – пораженные участки внутренних органов. Из патологического материала готовят препараты, окрашивают их метиленовым синим и по Граму, микроскопируют и делают посевы в МПБ.

При биопробе суспензию из патологического материала или бульонную культуру вводят кроликам подкожно в области ушной раковины, белым мышам – в спинную область. Через 2–4 суток, иногда позднее, на месте инъекции развивается воспалительная реакция, сопровождающаяся некрозом, затем начинается генерализация процесса, заканчивающаяся гибелью животных. Из пораженных участков готовят препараты, окрашивают их метиленовым синим и по Граму, микроскопируют. Делают посев в МПБ.

1. Провести микроскопию возбудителей в демонстрационных препаратах-мазках, изучить культуральные свойства возбудителей.

2. Изучить биопрепараты для специфической профилактики, лечения и серологической диагностики ботулизма, столбняка, злокачественного отека и фузариобактериоза.

1. Ассоциированная вакцина против вирусного энтерита, ботулизма и чумы плотоядных – комплексный препарат, состоящий из двух компонентов:

а) вакцина жидкая инактивированная против вирусного энтерита и ботулизма норок, используемая и как растворитель;

б) сухая живая культуральная вакцина против чумы плотоядных из штамма ЭПМ, вводится норкам с 2-месячного возраста в дозе 1 мл.

2. Ассоциированная вакцина против вирусного энтерита, ботулизма, псевдомоноза и чумы плотоядных.

3. Ассоциированная вакцина против вирусного энтерита, ботулизма и псевдомоноза норок.

4. Ассоциированная вакцина против вирусного энтерита и ботулизма норок.

5. Вакцина против ботулизма норок – представляет собой анакультуру штаммов серовара С-норка, преципитированную квасцами.

6. Ассоциированная формолквасцовая вакцина против ботулизма и пастереллеза норок.

Названные вакцины используют для иммунизации молодняка с 2-месячного возраста и взрослых животных, восприимчивых к ботулизму, двукратно с интервалом 7–10 дней, в дозе 1 мл первично и 2 мл повторно.

Антитоксическая гипериммунная сыворотка против ботулизма. Сыворотка обладает выраженным действием в течение 6–7 дней после ее применения.

Типовые ботулинистические сыворотки типов А, В, С, D, Е для постановки реакции нейтрализации. Используются для обнаружения в исследуемом материале ботулинистического токсина путем постановки РН на белых мышах.

Концентрированный столбнячный анатоксин – представляет собой преципитат 1%-ного квасцового анатоксина, изготовленного из активного столбнячного токсина путем обработки формалином, теплом, алюмокалиевыми квасцами и фенолом. Животных иммунизируют однократно, подкожно, в дозе 1 мл крупным животным, 0,5 мл мелким животным и молодняку.

Антитоксическая сыворотка против столбняка. Применяют с профилактической и лечебной целью. С профилактической целью сыворотку вводят подкожно, в дозе 8 000 АЕ взрослым животным, молодняку и мелким животным – 4 000 АЕ. С лечебной целью вводят в десятикратных дозах, в равных объемах подкожно и внутривенно.

1. Поливалентная концентрированная вакцина против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят – представляет собой смесь нативных токсических бульонных культур, обезвреженную теплом и формалином, адсорбированную на геле гидрата окиси алюминия. С профилактической целью вак-

цинируется все поголовье овец, начиная с 3-месячного возраста, а суягных маток – не позднее чем за 1,5–2 месяцев до окота. Вакцину вводят в мышцу бедра, двукратно с интервалом 20–30 дней, первично взрослым – 2 мл, молодняку – 1 мл; повторно – 3 и 1,5 мл соответственно.

2. Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец – представляет собой осажденный гидратом окиси алюминия, очищенный, концентрированный анатоксин *Cl. perfringens* типов С и D, *Cl. oedematiens* и анавакцину *Cl. septiquae*. Анатоксин применяют для профилактической иммунизации клинически здоровых овец в неблагополучных хозяйствах. Вводят вакцину в дозе 5 мл внутримышечно, двукратно с интервалом 20–25 дней.

Антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец. Препарат содержит антитоксины против *Cl. perfringens* типов В, С, D. Используется для лечения при сверхостром и остром течении заболевания.

Антитоксическая сыворотка *Cl. perfringens* типов А, С, D и Е для диагностики болезней животных, вызываемых микроорганизмами *Cl. perfringens*, – представляет собой активные сыворотки крови овец, гипериммунизированных антигенами соответствующих типов.

1. Латинское название возбудителей ботулизма и столбняка.
2. Латинское название возбудителей злокачественного отека и фузариобактериоза.
3. Опишите схему бактериологического исследования ботулизма.
4. Какова схема бактериологического исследования столбняка?
5. Опишите схему бактериологического исследования злокачественного отека.
6. Опишите схему бактериологического исследования фузариобактериоза.
7. Что служит материалом для исследования при бактериологической диагностике ботулизма и столбняка?

8. Что служит материалом для исследования при бактериологической диагностике злокачественного отека и фузариобактериоза?

9. Основы серологической типизации патогенных видов возбудителей ботулизма и столбняка.

10. Основы серологической типизации патогенных видов возбудителей злокачественного отека и фузариобактериоза.

11. Перечислите биопрепараты для специфического лечения и профилактики ботулизма.

12. Перечислите биопрепараты для специфического лечения и профилактики столбняка.

13. Основные биопрепараты для специфического лечения и профилактики злокачественного отека.

14. Перечислите биопрепараты для специфического лечения и профилактики фузариобактериоза.

15. Укажите причины копытного некробактериоза крупного рогатого скота.

ознакомиться с возбудителями микозов; изучить методы лабораторной диагностики.

культуры грибов на среде Сабуро; патологический материал от животных, больных трихофитией, микроsporией; плакаты и таблицы; препаративные иглы, оборудованное рабочее место бактериолога; таблицы по морфологии грибов.

– инфекционные болезни сельскохозяйственных животных и человека, вызываемые патогенными микроскопическими грибами. К микозам относятся дерматомикозы (трихофития, микроспория, парша, или фавус), бластомикозы, кандидомикозы, различные виды микроскопических плесневых грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* и др.

Возбудителями являются несовершенные грибы родов *Trichophyton*, *Microsporum*, *Achorion (Favus)*. Они имеют септированный мицелий, размножаются разными типами спор (артроспоры, алейрии, хламидоспоры) и микроконидиями.

Наиболее распространенными дерматомикозами являются трихофития и микроспория (стригущий лишай). Трихофитию вызывают различные виды трихофитона – *T. faviforme*, *T. verrucosum*, *T. equinum*, *T. gypseum*, *T. mentagrophytes*. Ею болеют крупный и мелкий рогатый скот, лошади, пушные звери, собаки, кошки, кролики. Восприимчивы мыши, крысы, морские свинки.

Микроспорию вызывают грибы рода *Microsporum* (*M. lanosum*, *M. gypseum*, *M. equinum*).

Возбудители трихофитии и микроспории поражают кожу (эпидермис), волосы, рога. Пораженный эпидермис отторгается чешуйками, а волосы обламываются, причем при микроспории – ближе к поверхности кожи.

Для микологического исследования посылают соскоб пораженного эпидермиса с захватом волос на границе пораженной и здоровой тканей. Патологический материал помещают на 15–20 мин в 10%-ный раствор едкого натрия на часовое стекло, подогревают. Затем несколько волосков препаровальной иглой или глазной пипеткой переносят на предметное стекло, покрывают предметным стеклом и микроскопируют (объективы 8[×] и 40[×]).

Выделение чистой культуры возбудителей производят путем посева на агар Сабуро (пептонный агар с глюкозой). Перед посевом исследуемый материал отмывают от щелочи физраствором. Культивируют при температуре 25–30 °С. Для подавления роста бактериальной флоры в среду добавляют антибиотики (пенициллин, стрептомицин по 100–200 ЕД/мл). Выросшие культуры изучают макроскопически и под микроскопом, используя объектив 8[×].

Микроскопическая картина грибов в препаратах, приготовленных из исследуемых культуры и материала, неодинакова. Как при трихофитии, так и при микроспории, грибы могут находиться внутри волоса (эндотрикс), на поверхности его (эктотрикс) или внутри и на поверхности (перендотрикс). При трихофитии мицелий не разветвлен, гифы и споры лежат правильными рядами вдоль волоса. При микроспории гифы и споры по отношению к волосу располагаются беспорядочно.

В препаратах из культур возбудителей трихофитии и микроспории мицелий разветвлен, септирован. У трихофитонов на концах гифов имеются своеобразные образования в виде рогов оленя, а у некоторых видов микроспор концы гифов имеют спиралевидную или ракетобразную форму. Грибы обоих родов образуют разного вида споры и

микроконидии, имеющие веретенообразную форму и разделенные перегородками. Макроконидии располагаются на концах гифов.

Возбудители микроспории под действием ультрафиолетовых лучей дают зеленоватое свечение, возбудители трихофитии не флюоресцируют, что можно использовать для их дифференциации. Для этих целей учитывают и характер расположения спор в пораженном волосе.

– дерматомикоз, клинически сходный с трихофитией и микроспорией. Болеют чаще птицы, реже млекопитающие. Возбудитель парши – *Achorion gallinae*, у человека – *A. schoenleini*. Поражает кожу, перья, когти, волосы. Поражения более глубокие, чем при стригущем лишае.

Материал и схема исследования такие же, как и при стригущем лишае. В патологическом материале мицелий тонкий, септированный, состоит из прямоугольных двухконтурных клеток. Споры разных типов, располагаются вдоль волоса беспорядочно, группами, реже цепочками.

Колонии на среде Сабуро вначале гладкие, бархатистые, белые, затем становятся складчатыми, мучнистыми, иногда окрашены в розовый цвет. Мицелий в колониях разветвленный, септированный; микроконидии разных типов; веретенообразные, разделенные перегородками.

(эпизоотический лимфангит, африканский сап) – *Histoplasma farciminosus* (*Cryptococcus farciminosus*). Болеют им сельскохозяйственные животные. Поражаются лимфатические узлы и сосуды кожи и подкожной клетчатки.

Для микологического исследования используют гнойный экссудат язв. Производят микроскопическое исследование и посевы на среду Сабуро. Культивируется с трудом. Из исследуемого материала готовят препарат по типу «раздавленной капли», не окрашивают. В патологическом материале мицелий быстро распадается на участки, которые имеют яйцевидную, эллипсоидную форму с выраженной двухконтурной оболочкой (криптококки) (рис. 57).

В питательной среде рост появляется через 10–12 дней; колонии сначала рыхлые, затем складчатые, кремового цвета, позднее становятся коричневыми.

В препаратах, приготовленных из культур, гриб имеет вид септированного мицелия. Размножается хламидоспорами. Лабораторные животные невосприимчивы.

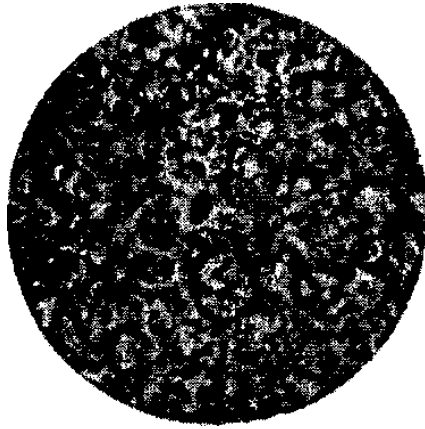


Рис. 57. Возбудитель бластомикоза в гное

Кроме микологического исследования применяется аллергическая проба с гистоплазмином (аллергеном), РСК с сапным антигеном.

(кандидоз, молочница) – заболевание животных и человека, вызываемое дрожжевыми грибами рода *Candida*, чаще видом *C. albicans*, реже *C. tropicalis*. Болеют птицы, поросята, телята и жеребята (рис. 58).



Рис. 58. *Candida albicans*

Возбудитель поражает слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, особенно ротовую полость с образованием налета в виде пленок.

У взрослого мелкого и крупного рогатого скота поражаются легкие и вымя. Отмечают кашель, вялость, истечения из носовой полости. Из зараженных четвертей вымени выделяется серозно-гнойный экссудат. Возможны повышение температуры, хромота и снижение молочной продуктивности.

Для микологического исследования в лабораторию посылают пленки (соскобы) со слизистой оболочки ротовой полости; от коров – молоко из пораженной доли вымени. Трупы птиц и мелких животных посылают целиком.

Схема исследования патологического материала при кандидомикозе примерно такая же, как и при исследовании на дерматомикозы: делают посевы на среду Сабуро, производят микроскопию материала и выделенной культуры. Для подавления роста бактериальной флоры материал перед посевом обрабатывают 0,5%-ным раствором фенола или формалина, а к питательной среде добавляют пенициллин и стрептомицин.

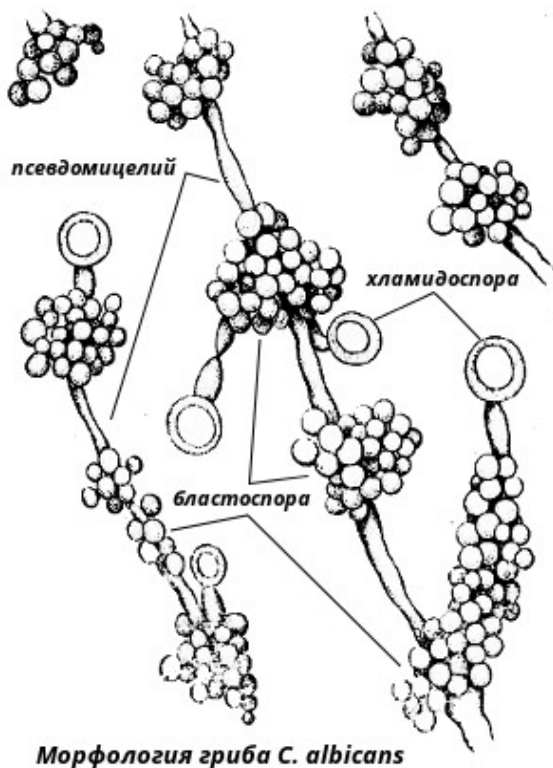
Рост появляется на 2–4-е сутки и заканчивается через 2 недели. Колонии могут быть гладкие и шероховатые, полупрозрачные белые или кремовые, сметанообразные.

Для микроскопического исследования на предметное стекло наносят каплю раствора Люголя или 1%-ного раствора метиленового синего и вносят небольшое количество исследуемого материала или культуры. Каплю накрывают покровным стеклом и микроскопируют, используя объективы 40^x и 80^x.

Можно изготовить и фиксированные препараты с окраской их по Граму. Все микроскопические грибы грамположительные.

В патологическом материале возбудитель кандидоза представляет собой дрожжеподобные клетки, почкующиеся и непочкующиеся, в культуре образуют псевдомицелий и бластоспоры (рис. 59).

Биопробу ставят на кроликах и белых мышках. Заражают культурой кроликов внутривенно, мышей внутрибрюшинно. При положительной пробе грибок развивается во всех внутренних органах подопытных животных.



Морфология гриба *C. albicans*

Рис. 59. *Candida albicans*

– незаразное заболевание, поражающее как домашних, так и диких птиц, реже млекопитающих (крупный (чаще) и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади), обусловленное грибом *Aspergillus fumigatus* и характеризующееся гранулематозным поражением органов дыхания, в основном легких, и серозных оболочек. Аспергиллезом болеет и человек.

Аспергиллы широко распространены в природе. На растительных остатках и в почве аспергиллы живут как сапрофиты. При благоприятных для их развития условиях и в процессе приспособления они приобретают свойства паразитов и развиваются в органах и тканях животных и человека.

Аспергиллезом чаще болеют птицы, затем (по убывающей) – лошади, крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы, олени. Источником возбудителя являются пораженные грибками корма (сено, солома, зерно и т. д.). Заболеванию способствуют факторы, снижающие резистентность организма (содержание животных в сырых, плохо вентилируемых помещениях, отсутствие прогулок, несбалансированное кормление и т. д.).

Животные в основном заражаются аэрогенным путем, но заражение может происходить и алиментарным путем проникновения грибка в организм. Заболевание в основном носит ограниченный характер, но иногда болезнь приобретает широкое распространение.

Источником возбудителя инфекции служат больные животные, когда они своими выделениями заражают корма, инвентарь и подстилку. Факторами, предрасполагающими к возникновению болезни, являются заболевания, нарушения зоогиgienических условий содержания, несбалансированное кормление, в особенности по витаминам.

Патологическим материалом для исследования служат трупы мелких животных, пораженные органы или их кусочки, наслоения, узелки, яйца, соскобы с трупов.

Лабораторный диагноз устанавливается на основании микроскопического исследования препаратов из патологического материала и выделения чистой культуры возбудителя. Для посева используют агары Чапека, Сабуро, кровяной, мозговой и кукурузный агары, МПА (рН 5,5–6,5). Гранулематозную ткань обжигают над пламенем, вырезают стерильные кусочки из середины и раскладывают их на агар в чашке Петри, а экссудат засевают в пробирки со средой. Инкубируют при температурах 25 и 37 °С. На 3–5-й день на плотной среде проявляются бархатистые голубовато-зеленые колонии гриба, которые затем становятся зеленовато-серыми (рис. 60, 61).

При микроскопии спороносящих колоний небольшую частицу гриба переносят прокаленной иглой на предметное стекло в каплю воды или 50%-ного водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. При исследовании узелка или ткани маленький кусочек материала измельчают скальпелем и помещают на предметное стекло в каплю 10–20%-ного едкого натрия. Препарат подогревают до отхождения паров, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

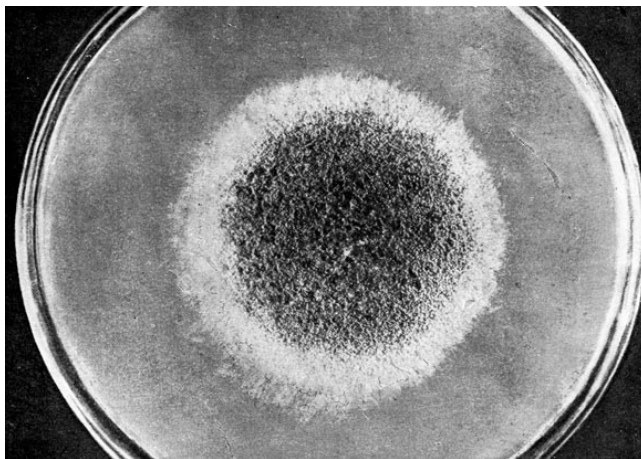


Рис. 60. Колония *Aspergillus flavus* Link.,
зеленовато-желтоватая от образовавшихся спорных головок,
мелкозернистая, окруженная кольцом белого мицелия.
Трехдневная культура на агаре Чапека



Рис. 61. Рост гриба *A. flavus* на початке кукурузы

Мицелий возбудителя аспергиллеза бесцветный, септированный. От него отходят многочисленные одноклеточные конидиеносцы с шаровидным вздутием на конце. На верхней части вздутия радиально

расположены стеригмы, несущие споры. Верхняя часть конидиеносцев окрашивается в зеленоватый цвет, споры темно-зеленые, 2,5–3 мкм в диаметре.

Размеры, окраска, интенсивность прорастания в питательную среду у разных видов аспергилл разнообразны (рис. 62).

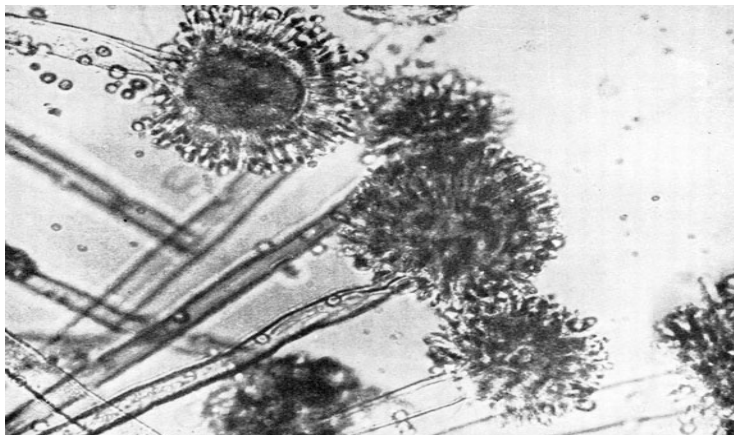


Рис. 62. Конечные головки конидиеносцев *Aspergillus flavus*.
На поверхности головок расположены стеригмы.
Заметны неотпавшие конидии на стеригмах

– это хроническое заболевание, характеризующееся развитием гранулематозного процесса в лимфатических узлах и легких, реже в других органах и тканях, вызываемое различными представителями рода *Mucor*, относящимися к низшим совершенным грибам.

Любой человек хотя бы раз в жизни встречался с одним из представителей грибного царства плесневых грибов, грибом *Mucor*, наблюдая его колонии на забытых баночках с консервированными овощами – белую плесень. Но не все знают, какую опасность может таить в себе *Mucor*, как источник грибкового заболевания под названием «
».

Впервые Лихтхейм в 1884 г. и Линдт в 1886 г. определили патогенность муковых грибов, полученных с плесневелого хлеба, при внутривенном введении их кроликам. Т. Смит в 1920 г. выделил 496 муковых грибов из пораженных тканей крупного рогатого ско-

та. У поросят болезнь наблюдал Христиансен в 1928 г., у норок – Мамберг и Джогенсон в 1950 г. Описаны случаи мукомикоза с поражением центральной нервной системы в 1943 г. Болезнь установлена у собак, убойного скота в 1955 г. и морских свинок в 1954 г. Саундерс в 1948 г. изолировал гриб *Lichtheimia* из абсцессов лимфатических узлов свиней. При бронхомикозе лошадей В. З. Черняк в одном случае выделил *Mucor pusillus*. Мукомикозы встречаются по всему земному шару.

Как и другие представители плесневых грибов, *Mucor* часто поселяется на несвежих пропадающих продуктах и может при невнимательности человека попасть в пищеварительный тракт. Небольшое количество грибка *Mucor*, попавшее в организм, вызовет лишь расстройство пищеварения и диарею. Но некоторые виды *Mucor* обладают токсичными свойствами и склонностью приживаться в организме человека, поражая различные органы и нанося порой смертельный вред здоровью.

К возбудителю мукомикоза восприимчивы свиньи, лошади, мелкий и крупный рогатый скот, пушные звери; из лабораторных животных – морские свинки, мыши. Патогенез мукомикоза развивается преимущественно у животных с низкой резистентностью.

Описаны случаи заболевания и человека.

Mucorales живут как сапробионты в окружающей природе и существуют в почве на весьма различных органических материалах, в расщеплении которых они участвуют (полисахариды, целлюлоза), иногда проявляя протеолитическую активность.

Материалом для лабораторного исследования на мукомикоз являются гной, некротическая ткань, экссудат и гранулематозная ткань. Диагноз ставят на основании микроскопического исследования и выделения чистой культуры. При микроскопии препаратов в положительных случаях обнаруживают несептированный мицелий, в крупных спорангиях на спороносном гифе – развивающиеся споры (рис. 63).

Для выделения чистой культуры с материалом поступают так же, как и при исследовании на аспергиллез. Культуры гриба вырастают на 3-и сутки после икубирования при температуре 25–30 °С в виде войлочных, серовато-белых колоний.

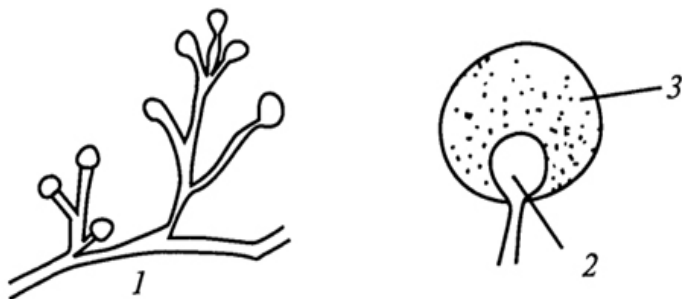


Рис. 63. Спорангии и спорангиеносцы у грибов рода *Mucor*:
 1 – плодоносящий мицелий; 2 – спорангиеносец; 3 – спорангий со спорами

1. Изучить морфологию плесневых грибов в препаратах «раздавленная капля» и на плотных питательных средах в пробирках и бактериологических чашках.

2. Изучить биопрепараты для специфической профилактики, лечения и серологической диагностики дерматофитозов (микроспория и трихофития).

1. Живая вакцина ЛТФ-130 для профилактики и лечения трихофитии крупного рогатого скота – представляет собой лиофильно высушенный препарат живого аттенуированного штамма 130 *T. verrucosum*. Вакцину вводят внутримышечно с профилактической целью двукратно с интервалом 10–14 дней, в дозах: телятам в возрасте от 1 до 4 месяцев – по 5 мл, от 4 до 8 месяцев – по 8 мл, старше 8 месяцев – по 10 мл. С лечебной целью вакцину вводят двукратно или трехкратно, в зависимости от степени поражения, в следующих дозах: телятам в возрасте от 1 до 4 месяцев – 10 мл, от 4 до 8 месяцев – 15 мл, старше 8 месяцев – 20 мл.

2. Концентрированная живая сухая вакцина ТФ-130(К) для профилактики и лечения трихофитии (стригущего лишая) крупного рогатого скота. Препарат вводят внутримышечно с профилактической целью

двукратно с интервалом 10–14 дней, в следующих дозах: телятам от 14 дней до 4 месяцев – 1 мл, телятам старше 4 месяцев и взрослым животным – 2 мл. С лечебной целью вакцину вводят так же, но дозы увеличиваются в 2 раза.

3. Препарат ТФ-13 (ВИЭВ) для профилактики и лечения крупного рогатого скота при трихофитии (стригушем лишае) – применяется с профилактической целью двукратно с интервалом 10–14 дней, внутримышечно, в дозах: телятам от 1 до 4 месяцев – 5 мл, от 5 до 8 месяцев – 8 мл, животным старше 8 месяцев – 10 мл. Введение препарата с лечебной целью осуществляется в двойных дозах, при сильной степени поражения через 10 дней после второй вакцинации препарат вводят третий раз.

4. Вакцина против дерматофитозов (трихофитии и микроспории) плотоядных животных, нутрий и кроликов – предназначена для профилактики и лечения трихофитии и микроспории у плотоядных зверей, нутрий и кроликов. Вакцинируют животных с 30-дневного возраста в дозе 1 мл внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней.

5. Вакцина СП-1 – представляет собой высокоиммуногенную культуру гриба штамма Л 2251/70, подвергнутую последовательному пассированию и целенаправленному отбору. Предназначена для лечения и профилактики трихофитии у лошадей. Вводят внутримышечно в области средней трети шеи, двукратно с интервалом 10–14 дней.

6. Вакцина «Ментавак» для профилактики и лечения трихофитии пушных зверей. Применяется в дозе 1 мл внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней.

7. Инактивированная вакцина против дерматофитозов «Поливак-ТМ». Препарат включает восемь видов грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum*. Используется для профилактики и лечения дерматофитозов у пушных и плотоядных зверей в дозе 1 мл внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней.

8. Инактивированная вакцина против дерматофитозов собак, кошек, кроликов и пушных зверей «Вакдерм». Используется с лечебной и профилактической целью в борьбе с дерматофитозами, вводится внутримышечно, двукратно или трехкратно (в зависимости от степени поражения) с интервалом 10–14 дней, в дозах: молодняку в возрасте от 1–3 месяцев – 0,5 мл, старше 3 месяцев – 1 мл.

9. Инактивированная вакцина против дерматофитозов кошек «Вакдерм-Ф». Применяется с лечебной и профилактической целью при

дерматофитозах у кошек, внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, в дозах: молодняку от 1–3 месяцев – 0,5 мл, старше 3 месяцев – 1 мл.

10. Вакцина «Микодерм» для профилактики и лечения микроsporии и трихофитии у животных. Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, молодняку 1–3-месячного возраста – 0,5 мл, старше 3 месяцев и взрослым животным – по 1 мл.

11. «Трививак» – вакцина для профилактики и лечения микроsporии у собак и кошек. Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, молодняку 1–3-месячного возраста – 0,5 мл, старше 3 месяцев и взрослым животным – по 1 мл.

12. Инактивированная сорбированная вакцина против дерматофитозов животных.

13. Сухая живая вакцина против трихофитии и микроsporии плотоядных и пушных зверей «Пушновак». Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, в следующих дозах: молодняку 1–3-месячного возраста – 0,5 мл, старше 3 месяцев и взрослым животным – по 1 мл.

14. Жидкая вакцина против микроsporии и трихофитии пушных зверей и кроликов «Миковак».

15. «Микканис» против микроsporии собак и кошек. Вакцину вводят внутримышечно, двукратно с интервалом 10–14 дней, молодняку 1–3-месячного возраста – 0,5 мл, старше 3 месяцев и взрослым животным – по 1 мл.

1. Латинские (международные) названия возбудителей микозов, дерматомикозов и бластомикозов.

2. Латинские (международные) названия возбудителей кандидомикоза и мукоромикоза.

3. Признаки болезней, морфология возбудителей.

4. Схема лабораторных исследований микозов.

5. Что служит материалом для лабораторных исследований возбудителей микозов?

6. Какие животные восприимчивы к возбудителям кандидомикоза и мукоромикоза?

7. Опишите морфологию плесневых грибов в препаратах «раздавленная капля» и на плотных питательных средах.

8. Перечислите биопрепараты для специфической профилактики и лечения микроспории и трихофитии.

9. Назовите, в каких случаях используются вакцины ТФ-13, СП-1 и ТФ-130(К).

10. Какие сухие и жидкие вакцины вы знаете? Опишите их.

11. Остаются ли спорообразующие микробы в стерилизованных мясных консервах?

12. Какие биопрепараты для специфической профилактики, лечения и серологической диагностики дерматофитозов вам известны?

13. Перечислите исторические этапы изучения мукомикоза.

14. Микроскопическая картина грибов в препаратах.

15. Основной возбудитель аспергиллеза. Какие животные болеют этим заболеванием и каковы меры профилактики?

ознакомиться с возбудителями микотоксикозов и изучить методы их лабораторной диагностики.

культуры грибов родов стахиоботрис, фузариум, дендродохиум на агаре Чапека в чашках Петри; препаратальные иглы, предметные и покровные стекла; таблицы и плакаты.

– алиментарные токсикозы, возникающие у животных после скармливания им кормов, содержащих токсины, вырабатываемые микроскопическими грибами.

Проблема микотоксинов и микотоксикозов животных в настоящее время стала не только экономической, но и социально значимой. Были произведены исследования по выявлению грибов, образующих микотоксины, субстратов, на которых они растут, условий роста грибов и образования токсинов, восприимчивых к токсинам животных и патологических изменений, вызываемых микротоксинами, по разработке методов обнаружения микотоксинов в кормах и продуктах питания, а также мер профилактики микотоксикозов.

Было выделено (по данным разных исследователей) 80–2 000 микотоксинов и установлено, что несколько видов грибов даже разных родов могут образовывать один и тот же токсин, а грибы одного вида могут продуцировать несколько токсинов. Механизм действия микотоксинов, кроме афлатоксина В₁, изучен недостаточно.

Проблема микотоксикозов в последние два десятилетия стала международной. Возникла новая отрасль науки – микробиология кормов. Многие ученые считают, что факторами, благоприятствующими развитию грибов в кормах и увеличивающими число случаев микотоксикозов, являются современные приемы земледелия, выращивание высокоурожайных, но с пониженной общей резистентностью культур, новые способы уборки урожая, транспортирования, хранения и приготовления кормов, густой посев, повторное выращивание культур на одном участке, нерациональное орошение, сев в ранние сроки, неправильное применение ядохимикатов.

В организм человека микотоксины могут попасть с продуктами питания растительного происхождения, а также с продуктами животноводства. Во избежание попадания микотоксинов в организм животного и человека в концентрациях, которые могут нанести вред их здоровью, в ряде стран установлены предельно допустимые количества (ПДК) некоторых токсинов в кормах для животных и в отдельных продуктах питания.

– остро- или подостропротекающий микотоксикоз, возникающий у животных при поедании кормов, пораженных сапрофитным грибом *Stachybotris alternans*, растущим на сене и соломе. Сапрофитный гриб стахиботрис альтернанс широко распространен в природе, выделен в различных странах. Существуют как токсические (*Stachybotrys alternans* var. *Jateli*), так и нетоксические формы (*Stachybotrys alternans* var. *Atoxica*).

Чувствительны к *Stachybotris alternans* лошади, крупный рогатый скот, овцы, птицы, свиньи.

Болезнь характеризуется некрозом слизистых оболочек, расстройством желудочно-кишечного тракта.

Мицелий гриба *Stachybotris alternans* септирован (поперечными перегородками), многоклеточный. От мицелия вверх развиваются спороносные гифы, конидиеносцы со стеригмами и сидящими на них конидиями (рис. 64).



Рис. 64. Черные споровые головки *Stachybotrys alternans* на концах конидиеносцев, образовавшихся симподиально на мицелии гриба. Рост на соломе

Толщина гифа зависит от возраста гриба и достигает 2–3 мкм. Воздушные гифы образуют коремии. Конидиеносцы бесцветные, гладкие, в верхней части бородавчатые, 45–52 мкм длиной и 4 мкм в диаметре. Конидиеносцы разветвленные на конце с розеткой булавовидных (яйцевидных) стеригм, сросшихся у основания в количестве 5–8, реже 9 шт.

На стеригмах образуются конидии. На вершине стеригмы вначале вырастает небольшое вздутие, которое увеличивается в длину и ширину, постепенно пигментируется. Созревшие конидии отделяются от стеригм, на их месте образуются новые.

Конидии – одноклеточные, эллипсоидальные или яйцевидные, молодые – гладкие, зрелые – шиповатые. Легко опадающие. Споры вначале бесцветные или бледно-оливковые, с возрастом темнеющие, оливково-бурого, черного цвета, длиной до 8–12 мкм и шириной до 6–8 мкм. В зависимости от условий культивирования морфологические признаки варьируются.

Культуральные свойства Stachybotrys alternans. В естественных условиях гриб растет на влажных растительных кормах, богатых целлюлозой (солома, сено, мякина, семена бобовых и кукурузы), реже на сочных кормах (силос, сенаж). Пораженные корма чернеют, образуется сажистый, легко снимающийся налет (рис. 65).

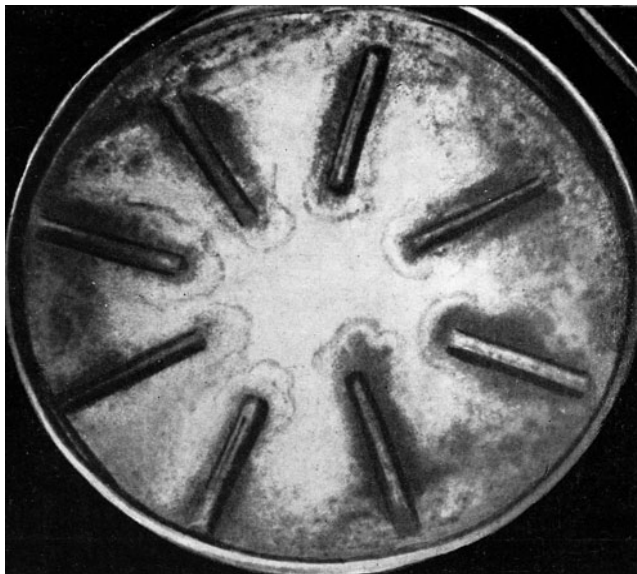


Рис. 65. Черный сажистый налет *Stachybotrys alternans* на отрезках пораженной соломы. Вокруг соломинок заметны зоны черноватого налета гриба в чашке Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной жидкой питательной средой

Для искусственного культивирования используют жидкие и плотные питательные среды (агар Чапека, среду Сабуро, сусло-агар Ваксмана и среду Ван-Итерсона).

В жидких средах гриб дает поверхностный рост, вначале в виде пристеночного кольца из субстратного мицелия гриба, а с 5–6-х суток – в виде студневидной пленки.

При культивировании на жидких средах без механической опоры рост гриба погруженный, хлопковидный, с образованием хламидоспор, среда остается прозрачной.

На плотных средах (среда Сабуро, агар Чапека) вырастают двухзонные колонии, в центре складчатые, черного цвета; на периферии колонии образуется белая или серо-белая каемка (рис. 66).

Колонии непроясвечивающиеся, овальной формы. Среда вокруг колонии окрашена в бурый цвет, часто с темно-вишневым оттенком.

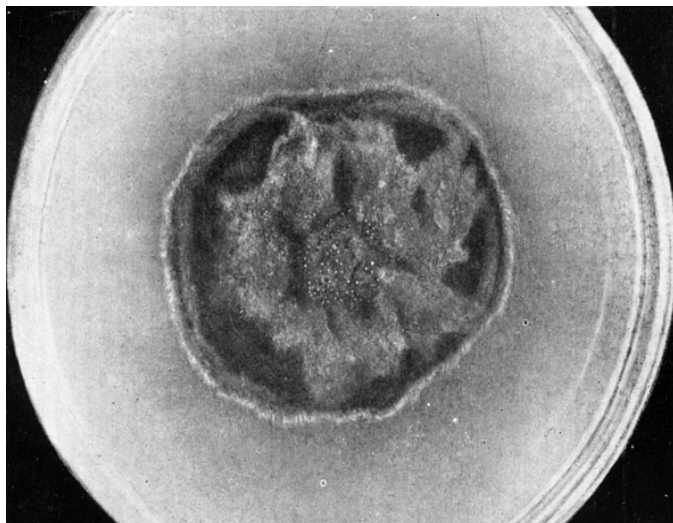


Рис. 66. Серовато-черная двухнедельная колония *Stachybotrys alternans* в чашке Петри на агаре Чапека. По неровному краю колонии – светлый ободок мицелия. В центре колонии образовались мелкие капельки жидкости

На сусло-агаре колония черная с радиальными бороздками и с лущистой периферией.

На среде Сабуро центральная зона колонии с возрастом приобретает черный цвет с радиальными, глубокими бороздками, с выраженной каемкой на периферии белого стелющегося мицелия.

На фильтровальной бумаге со средой Ван-Итерсона на 7–12-е сутки образуется черный, иногда с зеленоватым оттенком сажистый налет.

На средах с аммиачными солями появляются грушевидные хламидоспоры, одиночные или четкими рядами.

– ряд микотоксикозов, развивающихся при скармливании кормов, содержащих микотоксины, продуцируемые грибами из рода *Fusarium* (рис. 67).

Фузариотоксикоз – отравление животных кормами, загрязненными микотоксинами.

Об отравлении зерном, пораженным грибами рода *Fusarium*, впервые в 1882 г. сообщил Н. А. Пальчевский. Основы изучения фузариотоксикозов были заложены отечественными учеными.

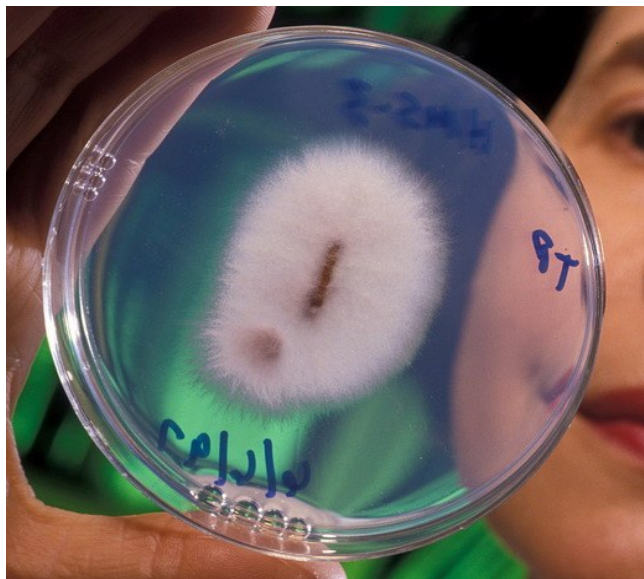


Рис. 67. Гриб *Fusarium*

Эстрогенный синдром у свиней (зеараленонтоксикоз, Ф-2 токсикоз, микотический вульвовагинит неполовозрелых свинок) зарегистрирован впервые В. В. Курасовой, А. Н. Леоновым и Д. М. Голбаном (1973) в некоторых хозяйствах Молдавии. В дальнейшем аналогичные признаки болезни свиней в отдельных хозяйствах южных районов СССР наблюдали Е. В. Башмакова в 1978 г. и Г. Якуб в 1978 г.

Несмотря на то, что неоднократно указывалось на связь заболевания с употреблением перезимовавших злаков, грибная этиология болезни была раскрыта лишь в 1943 г. (А. Х. Саркисов, Е. С. Квашнина, В. П. Королева, Н. С. Акулова и др.). В результате проведенных исследований из перезимовавших злаков был выделен гриб *Fusarium sporotrichiella* и доказана его этиологическая роль в возникновении болезни: культуры этого гриба при скармливании различным видам животных вызывали такую же картину заболевания, как и перезимовавшее зерно.

Отравление вызывают следующие грибы: *F. sporotrichioides* (рис. 68), *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. tricinctum*. Фузарии рас-

пространены повсеместно. Они поражают хлебные злаки, кормовые культуры, плоды.



Рис. 68. Микроконидии гриба *Fusarium sporotrichioides*

Фузарии хорошо растут при температуре 18–24 °С, грибы образуют токсичные вещества. На картофельном агаре мицелий гриба пышный, белого или нежно-розового цвета. При микроскопии обнаруживаются шаровидные, грушевидные или лимоновидные микроконидии.

Токсическое действие обусловлено высокой липидотропностью микотоксинов фузариума, поступлением их в липидные компоненты клеточных мембран кожи, слизистой пищеварительного канала и центральной нервной системы, в результате чего возникают местные воспалительно-некротические очаговые поражения кожи, слизистых оболочек и общее резорбтивно-токсическое действие.

Чувствительны к данному микотоксикозу свиньи, крупный рогатый скот, птицы, которым скармливали зерно, отравленное *Fusarium sporotrichioides*. Чувствителен к отравлению и человек при употреблении так называемого «пьяного хлеба», выпеченного из зерна, пораженного токсигенным грибом. У животных и человека отмечают поражение центральной нервной системы, желудочно-кишечного тракта, развитие токсической алейкии, аборт.

– микотоксикоз, возникающий у животных после скармливания им грубых кормов, пораженных грибом *Dendrodochium toxicum*, характеризующийся расстройствами центральной нервной, сосудистой и пищеварительной систем, кровоизлияниями во внутренних органах, некрозами губ и слизистых оболочек.

Впервые род *Dendrodochium* описал Бонорден в 1851 г. В 1937–1940 гг. коллективом исследователей (В. И. Билай, Н. М. Подопличко, Ф. М. Пономаренко, В. И. Борисович) была установлена болезнь лошадей, вызванная грибом *Dendrodochium toxicum*. В последующие годы выяснено, что она может возникнуть у свиней, овец (Н. А. Спесивцева, В. П. Королева, 1956; И. А. Курманов, 1960) и кур.

При поражении естественных субстратов, богатых клетчаткой, а также при росте на искусственных питательных средах гриб образует и накапливает в них токсичные метаболиты – дендродохины, которые и служат причиной отравления человека и животных.

Из лабораторных животных наиболее чувствительны к токсину кролики, морские свинки, мыши и крысы.

Возбудитель дендродохиотоксикоза состоит из септированного мицелия, конидиеносцы разветвленные, конидии удлинённые с заостренными концами на агаре Чапека. Колонии в виде плотного сплетения гифов темно-зеленого цвета с белыми пушистыми ободками (воздушный мицелий). На соломе колонии гриба белого цвета с пушистым ободком.

Диагноз ставят на основании клинических симптомов и патологоанатомической картины, но главным основанием служит микотоксилогический анализ кормов.

В группу микотоксикозов относят и клавицепстоксикоз, возбудителем которого является гриб *Claviceps paspali*, относящийся к спорангиевым грибам, паразитирующим на растениях. Образует склероции (плотные сплетения гифов) в виде темных рожков или другой формы. Размножается конидиями и аскоспорами.

Возбудителями аспергиллотоксикозов являются грибы рода *Aspergillus*, виды: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*.

Аспергиллы имеют септированный и несептированные конидиеносцы, заканчивающиеся утолщениями, на которых находятся стеригмы и отделяющиеся от них конидии. Микотоксикозы могут вызываться кормом, пораженным грибами из родов *Penicillium* и *Mucor*.

Кроме описанного выше, возможен следующий вариант токсико-биологического исследования. Для определения токсичности готовят вытяжку (экстракт) из пораженного корма или полученной культуры. Экстрагируют эфиром, ацетоном или хлороформом в аппарате Сокслета или в стеклянной бане с притертой крышкой. Вытяжку выпаривают в водяной бане при температуре 45–50 °С. Токсичность определяется алиментарно или постановкой кожной пробы.

Алиментарная проба проводится на белых мышах, морских свинках, кроликах, цыплятах, утятах путем скармливания корма или вытяжки в течение 3 дней. Каждая проба ставится на кроликах.

Для этого на свежевыбранный участок размером 4×5 см² втирают экстракт. В положительном случае через 1–3 дня отмечаются гиперемия, отечность, иногда некроз. Биопробу можно ставить и на куриных эмбрионах.

1. Изучить морфологию возбудителей микотоксикозов.
2. Освоить лабораторную диагностику микотоксикозов.

При диагностике микотоксикозов наибольшее внимание уделяют обнаружению токсина, так как к моменту исследования грибопродукент может погибнуть.

Лабораторная диагностика микотоксикозов включает токсико-биологическое, микологическое и физико-химические исследования. Материалом для исследования на микотоксикозы служат пробы всех кормов, входивших в суточный рацион животного в течение 1 месяца до проявления болезни, а также остатки кормов из кормушки, желудочное содержимое павших животных.

При *токсико-биологическом исследовании* определяют наличие токсина в корме на различных биологических моделях: кроликах, аквариумных рыбках гуппи, белых мышах или сельскохозяйственных животных. Чаще всего для этих целей используют кроликов, которым в кожу втирают выпаренный эфирный или ацетоновый экстракт корма. По проявлению воспалительной реакции на месте аппликации экстракта судят о наличии токсина или токсичности корма.

Оценку результатов производят на следующий день после второго нанесения экстракта. Если корм нетоксичный – отсутствуют воспалительная реакция и изменения на коже; слаботоксичный – появляются шелушение кожи, отечность, болезненность, незначительное утолщение кожи с образованием отдельных корочек; токсичный – резкая гиперемия, отек, утолщение кожи, болезненность, появление язвы и струпа.

Микологический анализ включает в себя выделение и идентификацию грибов – продуцентов микотоксинов из кормов. С этой целью делают посевы из кормов в чашки Петри с агаром Чапека, сусло-агаром или в жидкую среду Билай. Посевы культивируют в течение 3–10 дней при температуре 22–25 °С до появления характерного спороношения, после чего проводят макро- и микроскопические исследования культур с целью идентификации. При микроскопическом исследовании учитывают различные признаки выросших колоний: цвет, форму, консистенцию, характер роста, наличие склероциев, пигмента, степень развития воздушного мицелия. Затем готовят препараты «раздавленная капля». Препараты микроскопируют с помощью малого объектива. Токсичность культур определяют методом кожной пробы на кроликах или другим методом, физико-химический анализ (люминесцентный метод, хроматография и др.) проводят с целью качественного и количественного определения микотоксинов в кормах и других материалах.

Лабораторное исследование на стахиботриотоксикоз проводят путем микроскопии материала, получения чистых культур грибка на питательных средах и испытания токсичности корма, соломы и выделенной культуры. Для микроскопии отбирают соломинки, покрытые черным налетом, соскабливают небольшое количество его на предметное стекло в каплю 50%-ного водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом, после чего исследуют под микроскопом. При этом обнаруживают бесцветные нити мицелия с перегородками. От мицелия отходят плодоносящие гифы-конидиеносцы с 5–7 стеригмами на концах, расположенными в виде розетки. На стеригмах находятся легко опадающие споры – конидии. Верхняя часть конидиеносцев, стеригмы и конидии окрашены от светло-зеленовато-оливкового до буро-коричневого или почти черного цвета.

При культивировании на твердых питательных средах вокруг соломинок появляются черные непрозрачные колонии овальной формы. Среда также постепенно окрашивается в черно-коричневый цвет.

Выращивание проводят при температуре 22–25 °С. Рост появляется на 7–12-й день. Методика проведения токсикобиологического анализа приведена выше.

Лабораторное исследование на фузариотоксикоз в основном направлено на проведение микотоксилогического анализа, позволяющего определить дерматонекротическое действие токсических веществ грибов рода фузариум. Положительный результат кожной пробы на кролике является показателем для проведения специального исследования на наличие токсинов Т-2 или Ф-2.

Можно получать также и культуру гриба. При этом из средней пробы зерна отбирают 100–200 явно пораженных зерен и раскладывают их в бактериологические чашки на фильтровальную бумагу, увлажненную жидкой средой Чапека или другой средой. Выдерживают в термостате при температуре 20–24 °С в течение 3–5 суток. При этом пораженные зерна покрываются пушком белого или розоватого налета. Для определения вида гриба его отсеивают на картофельный агар. На этой среде гриб имеет распространенный хлопьевидный мицелий белого или розоватого цвета. Нити мицелия довольно толстые, разветвленные, разделенные перегородками (исследование кусочка мицелия проводится в капле воды под объективом 40^x). Микроконидии удлиненной формы, серповидно изогнутые, с несколькими поперечными перегородками.

1. Названия микотоксикозов и их возбудителей.
2. Морфологическая и культуральная характеристики возбудителей микотоксикозов.
3. Назовите методы лабораторного исследования на микотоксикозы.
4. Заболевания, возникающие у животных после скармливания им кормов, загрязненных токсинами, вырабатываемыми микроскопическими грибами.
5. Последовательность лабораторной диагностики на фузариотоксикоз.
6. Как проводят лабораторное исследование на стахиботриотоксикоз?
7. Перечислите основные клинические признаки микотоксикозов у животных.

8. Исторические этапы изучения дендродохиотоксикоза.
9. Грибы какого рода являются возбудителями аспергиллотоксикозов?
10. На каких животных проводится алиментарная проба на аспергиллотоксикоз и дендродохиотоксикоз?
11. Назовите животных, которые наиболее чувствительны к фузариотоксикозу.
12. Перечислите исторические этапы изучения фузариотоксикоза.
13. Перечислите питательные среды, на которых растут *Stachibotrys alternans*.
14. Как сделать микотоксилогический анализ, позволяющий определить дерматонекротическое действие токсических веществ грибов рода фузариум?

ознакомиться с вирусологической лабораторией, возбудителями бешенства, ящура, с биологическими свойствами и методами лабораторной диагностики.

таблицы, слайды, препараты возбудителей вирусных инфекций, микроскопы.

– это острая инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая вирусом *Rabies virus*, обладающим нейротропными свойствами, содержащимся в большом количестве в головном мозге и слюне заболевших животных. Вирус может быть выявлен в отпечатках роговицы глаза. Размеры вируса составляют 100–150 нм. При размножении его в инфицированных клетках нервной ткани развиваются своеобразные включения, специфические для бешенства, – тельца Бабеша – Негри.

Бешенство (водобоязнь, *Lyssa*, *Rabies canina*, *Hydrophobia*) известно давно как заболевание диких и домашних животных. Вирус бешенства избирательно поражает клетки центральной нервной системы, поэтому заболевание сопровождается возбуждением, судорогами, а затем наступают параличи.

К бешенству восприимчивы все виды домашних и диких теплокровных животных, а также и человек. Повышенной восприимчивостью отличаются дикие представители семейства собачьих (лисица, волк, шакал, енотовидная собака) и куньих, летучие мыши, грызуны многих видов, а также домашняя кошка. Очень восприимчивы птицы. Менее восприимчивы человек, собаки, рогатый скот, лошади. Молодые животные более чувствительны к вирусу, чем взрослые.

Вирус бешенства имеет форму палочки размером 100–150 нм, покрыт оболочкой (рис. 69). В цитоплазме пораженных клеток образует включения, которые были описаны в 1892 г. Бабешом, а в 1903 г. – Негри. Их называют тельцами Бабеша – Негри. Форма включений сферическая, величиной 1–20 мкм, по Романовскому окрашиваются в красный цвет. Обнаружение их в клетках аммонова рога имеет диагностическое значение.

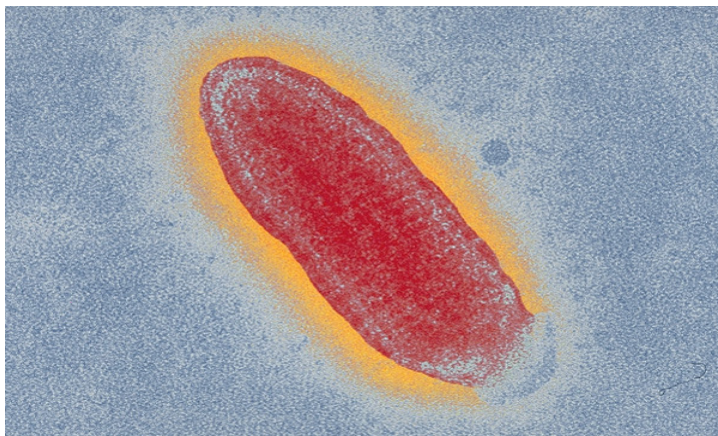


Рис. 69. *Rabies virus* (имеет форму палочек и покрыт оболочкой)

Вирус культивируется в мозговой ткани мышиноного эмбриона, при заражении в желточный мешок или мозг куриных эмбрионов, а также в организме кролика.

Различают два типа вируса бешенства: уличный вирус, который выделяют от больных людей и животных, и фиксированный вирус, полученный Пастером при длительных пассажах уличного вируса через мозг кролика (вирус фикс). Вирус фикс вызывает при заражении кроликов паралич через строго фиксированный, сокращенный инкуба-

ционный период, составляющий 3–7 дней. Он непатогенен для человека, собак и других животных, не выделяется со слюной животных и человека, редко обнаруживается в периферических нервах и не образует телец Бабеша – Негри. Фиксированный вирус, потерявший вирулентность для человека и животного, используют при изготовлении антирабических вакцин. В механизме иммунитета, возникающего после введения вакцин против бешенства, наибольшее значение имеет феномен интерференции вирусов. Сущность этого феномена заключается в способности одного вида вируса, внедрившегося в клетку хозяина, задерживать репродукцию другого вида вируса, попавшего в эту же клетку позже. Фиксированный вирус, имеющий большую тропность к нервной ткани, быстро размножается в ней и препятствует развитию уличного вируса.

Вирус бешенства малоустойчив во внешней среде: быстро погибает при нагревании, под действием солнечных лучей и дезинфицирующих веществ (формалин, фенол, сулема). В 50%-ном глицерине может сохраняться при температуре $-20...-40$ °С в течение нескольких лет.

К уличному вирусу бешенства восприимчивы все теплокровные дикие и домашние животные, в меньшей степени – птицы. У лабораторных животных (кролики, белые мыши, морские свинки) возникают паралитические формы бешенства при различных путях заражения.

Вирусологическая диагностика. Методы прижизненной индикации вируса бешенства не разработаны. Диагноз ставится на основании типичной клинической картины заболевания. После смерти в пораженных клетках мозга находят тельца Бабеша – Негри. Специфический антиген можно обнаружить также методом флюоресцирующих антител. Вирус можно выделить путем заражения лабораторных животных: кроликов, белых мышей и морских свинок, при вскрытии которых в клетках пораженного мозга обнаруживают включения Бабеша – Негри.

С целью *специфической профилактики* вводят антирабическую вакцину, впервые предложенную Пастером. Вакцины готовят из взвеси мозговой ткани кроликов, овец или сосунков белых крыс, зараженных фиксированным вирусом бешенства. Существуют различные типы вакцин, отличающиеся между собой количеством и качеством консервантов. Вакцина Ферми содержит 1 % фенола, вакцина Семпля – 0,25 % фенола, вакцина Филлипа – глицерин. В последние годы предложена живая антирабическая вакцина из вируса, который культивируется на эмбрионах птиц (вакцина Флери). Действие вакцины основано на явлении интерференции вирусов. Вакцинации подвергаются

все люди, укушенные или ослоненные больными или подозрительными на бешенство животными. Противопоказаний к применению вакцины не имеется, так как это единственный способ спасения зараженных. Обычно прививки делают многократно в течение 12–30 дней и более в зависимости от тяжести укуса, его локализации, времени, прошедшего после укуса. Вакцину вводят подкожно в область живота.

Прививки необходимо начинать как можно раньше после укуса и проводить согласно существующей инструкции. Иммунитет, возникающий после прививки, сохраняется до 6 месяцев. Людям при появлении признаков заболевания прививки не делают. При тяжелых укусах в области головы, шеи одновременно с антирабической вакциной вводят гамма-глобулин или антирабическую сыворотку. За подозрительными животными ведут наблюдение в течение 7 дней и, если признаков заболевания не наблюдается, их считают здоровыми. Эффективные методы лечения бешенства отсутствуют.

Ящур (*Aphtaе еrizooticaе*) – остро протекающая вирусная высококонтагиозная болезнь домашних и диких парнокопытных животных, характеризующаяся лихорадкой, афтозным поражением слизистой оболочки ротовой полости, кожи, вымени и межкопытной щели конечностей; у молодняка животных – поражением миокарда и скелетных мышц. Иногда ящуром болеют люди, особенно дети.

Ящур регистрируется во многих странах мира, в Республике Беларусь это заболевание регистрировалось в 1983 г.

Экономический ущерб складывается из 100%-ной заболеваемости животных, потери упитанности, молока у коров, а также снижения качества продукции (рис. 70). Эпизоотии ящура препятствуют нормальной хозяйственной деятельности целых районов, областей и даже государств.

Возбудитель болезни – РНК-содержащий вирус, сферической формы, размером 20–30 нм, который относится к семейству *Picornaviridae*. Установлено 8 серологических типов, обозначаемых заглавными буквами алфавита, и более 80 вариантов вируса ящура. Каждый серотип имеет серовары – их обнаружено 59. Перекрестный иммунитет выражен частично.

Типы и варианты вируса различаются иммунологически: каждый из них может вызывать заболевание животного, иммунного к другим типам и вариантам вируса. Вирус ящура устойчив во внешней среде: на шерстном покрове животных вирус сохраняется до 50 дней, на одежде – до 100 дней, в кормах и почве – до 150 дней.

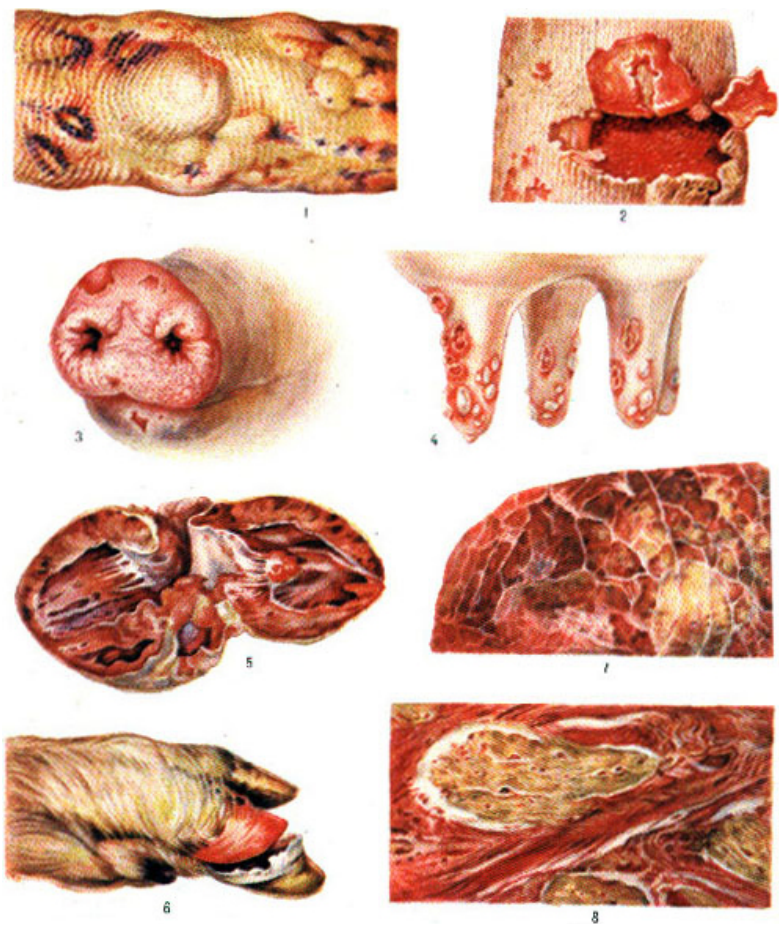


Рис. 70. Ящур у сельскохозяйственных животных:

- 1 – язык коровы с нескрывшимися афтами;
- 2 – язык коровы с скрывшимися афтами;
- 3 – афты и эрозии на пяточке и нижней челюсти свиньи;
- 4 – афты на сосках вымени коровы; 5 – миокардит у свиньи;
- 6 – спадание копыта у свиньи;
- 7 – поражение скелетных мышц у коровы при злокачественной форме ящура;
- 8 – разрастание соединительной ткани в сердце после ящурного миокардита

Кипячение инактивирует вирус моментально, из дезинфицирующих средств наиболее эффективными являются 2–3%-ный раствор гидроксида натрия и 1%-ный раствор формальдегида.

Мероприятия по профилактике базируются на недопущении попадания вируса ящура в благополучные по этому заболеванию хозяйства или государства. Основными причинами распространения ящура на современном этапе являются: занос вируса из сопредельных неблагополучных по этому заболеванию стран, в первую очередь в связи с нелегальным ввозом животных, продуктов животноводства и кормов; миграция людей (туризм, паломничество, стихийные бедствия, военные конфликты и т. д.), диких животных и птиц; возросшее движение автотранспорта, в том числе грузового, и др.

При появлении заболевания в хозяйстве вводят карантин, выставляются милицейско-ветеринарные посты для обеспечения карантинных мер (рис. 71).



Рис. 71. Объявление карантина в очаге заболевания

При появлении первичных очагов ящура больных животных уничтожают с последующей утилизацией на территории очага возникновения заболевания. Остальных (клинически здоровых) животных этой фермы убивают на мясокомбинате. При отсутствии возможности для убоя на мясокомбинате таких животных все поголовье подлежит

умерщвлению и утилизации непосредственно на территории очага. В случае массового распространения заболевания клинически здоровых животных прививают против ящура.

Карантин снимается через 21 день после последнего случая выздоровления, падежа или вынужденного убоя животных и проведения заключительной дезинфекции. Переболевшие животные подвергаются убою, мясо и внутренние органы их перерабатываются на вареные колбасы.

1. Ознакомиться с морфологией вируса и тельцами Бабеша – Негри, культурами клеток, вирусологической лабораторией, аппаратурой.

2. Освоить лабораторную диагностику бешенства, ящура.

Лабораторная диагностика бешенства основывается на обнаружении в мозге теляц Бабеша – Негри; при жизни – в отпечатках роговицы глаза специфического антигена методом флюоресцирующих антител; индикации вируса методом биопробы на лабораторных животных (интрацеребральное или субдуральное введение вирулентной мозговой взвеси кроликам). Для биологической пробы берут кусочки размером 0,5–1 см из разных отделов мозга: коры больших полушарий, мозжечка, продолговатого мозга и аммонова рога.

Метод флуоресцентных антител – наиболее быстрый и точный метод лабораторной диагностики бешенства. Для выявления вирусного антигена в мазках-отпечатках мозга, слюнных желез и роговицы глаза (прижизненный тест) используют прямую и непрямую реакцию иммунофлюоресценции. Мазки фиксируют в холодном ацетоне в течение 8–10 ч при температуре 4 °С и обрабатывают во влажной камере в течение 30 мин антирабическим иммуноглобулином, меченым ФИТЦ, промывают фосфатным буфером, высушивают и исследуют в люминесцентном микроскопе. Антигены вируса наблюдаются в виде зеленых гранул разной формы и величины.

Метод обнаружения включений Бабеша – Негри является достаточно специфичным для бешенства, хотя он менее чувствителен, чем метод флуоресцентных антител. В ткани мозга собак тельца находят в 90–95 % случаев, а у людей, умерших от бешенства, – в 70 %. Следо-

вательно, отсутствие телец Бабеша – Негри не исключает диагноза бешенства. В таких случаях необходимо использовать и другие методы исследования.

Тельца Бабеша – Негри при лабораторной диагностике могут быть обнаружены в окрашенных мазках и отпечатках из нефиксированной мозговой ткани, а также в гистологических срезах. Предложено много методов окраски телец Бабеша – Негри, но чаще для мазков и отпечатков используют окраску по Муромцеву – Селлерсу, а для гистосрезов – окраску по Туревичу, Муромцеву.

Тельца Бабеша – Негри представляют собой цитоплазматические включения размером 1–40 мкм, округлой, овальной или продолговатой формы. По Туревичу окрашиваются в красный цвет, а по Муромцеву – в фиолетовый. Более точным является метод флуоресцирующих антител, с помощью которого можно выявить внутриклеточные тельца.

Биологический метод применяют для выделения вируса бешенства из тканей мозга, слюнных желез трупов и слюны больных людей и животных (прижизненный тест). Наиболее пригодными для заражения являются мышцы-сосунки. Для постановки биопробы используют 15–20 животных. Заражение проводят под наркозом путем интрацеребрального введения 0,03 мл суспензии исследуемого материала. Можно поставить биологическую пробу и на сирийских хомячках, заражая их материалом внутримышечно. При наличии в исследуемом материале вируса бешенства у мышей возникает тремор мышц, паралич. В большинстве случаев животные погибают в течение 5 дней. Наличие рабического вируса у зараженных и погибших мышей необходимо подтвердить с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции или обнаружения телец Бабеша – Негри. Идентификацию обнаруженного вируса бешенства проводят также с помощью реакции нейтрализации на белых мышах.

Серологические исследования проводят для определения поствакцинального иммунитета. Антитела против вируса бешенства обнаруживают в реакциях нейтрализации, связывания комплемента, иммунофлуоресценции. Чувствительными являются иммуносорбентные реакции (радиоиммунный и иммуноферментный анализы).

Лабораторная диагностика ящура основана на эпизоотологических данных, клинических признаках болезни, патологических изменениях и лабораторных исследованиях. Подозрение на ящур вызывает любое заболевание восприимчивых животных, характеризующееся появлением везикулярной сыпи в ротовой полости, на конечностях и

вымени, повышенной саливацией, чмоканьем, затрудненным приемом и пережевыванием корма, а при осмотре ротовой полости – обнаружением афт и эрозий. Вместе с тем обращают внимание на продолжительную хромоту, афты на венчике и в области межкопытной щели, иногда спадение рогового башмака, афты на сосках и болезненность последних при доении и сосании с сильно выраженным защитным рефлексом.

Лабораторная диагностика основана на выделении вируса, индикации, идентификации и типировании вируса ящура.

Лабораторная диагностика ящура предусматривает выявление и идентификацию специфического типичного и вариантного антигена вируса ящура непосредственно в патологическом материале, полученном от животных с клиническими признаками болезни; изоляцию и индикацию вируса с помощью биопробы на белых мышках и морских свинках или зараженных первичных культур клеток почек телят, а также проведением биопробы на крупном рогатом скоте; идентификацию вируса с помощью РСК, РДП, ИФА, РН (в культуре клеток методом перекрестного иммунитета на крупном рогатом скоте, морских свинках и вакцинированном рогатом скоте).

В лаборатории патологический материал немедленно исследуют с помощью РСК, РДП, РНГА (с антигенным эритроцитарным диагностикумом) и ELISA-тестом для выявления ящурного антигена и его типизации. Одновременно суспензией патологического материала заражают первичные культуры клеток почек телят ВНК-21. В случае наличия вируса ящура через 1–3 суток появляется ЦПД. Специфичность клеточной дегенерации контролируют с помощью РСК.

Для проведения биопробы используют 10 мышей 4–6-дневного возраста и 5 морских свинок, а в случае необходимости проводят заражение 2 животных крупного рогатого скота 18-месячного возраста. Через 2–3 суток в месте инокуляции инфекционного материала появляются афты. Для подтверждения специфичности кожных изменений осуществляют отбор, изготовление суспензии и исследование с помощью РСК. Результаты исследования на ящур считают отрицательными в случае отсутствия гибели белых мышей, а также ящурного антигена в исследуемых с помощью РСК суспензиях.

Для определения типов вируса ящура в стенках и содержимом афт больных ящуром животных, а также в вирусосодержащих суспензиях из культур клеток и мышечной ткани инфицированных кроликов и мышей применяют реакцию косвенной гемагглютинации. Определение

типов вируса ящура в патологическом материале и изучение антигенных свойств эпизоотических штаммов осуществляют с помощью реакции иммунодиффузии. Ретроспективную диагностику ящура проводят путем выявления и типичной идентификации специфических антител в сыворотках крови переболевших животных с помощью РН, РНГА, РДП, РИФ и реакции серозамещения на белых мышах 4–6-дневного возраста.

Серологическую идентификацию вируса ящура проводят с афтозным материалом, полученным от больного животного, или с материалом от зараженных животных или с инфицированной культурой клеток при использовании РСК, РДП с заведомо известными сыворотками.

1. Методы выделения вирусов.
2. Культивирование вирусов.
3. Методы окраски микропрепаратов для выделения вирусов и их антигенов.
4. Как проводят серологическую идентификацию вируса ящура?
5. Что предусматривает лабораторная диагностика?
6. В каких случаях применяют биологический метод исследования?
7. Что такое карантин? Для чего он вводится, когда снимается?
8. Назовите возбудителя болезни ящура. Опишите его.
9. Какие типы и варианты вируса ящура вы знаете?
10. Что такое вакцинация? В каких случаях она применяется?
11. Как проводится вирусологическая диагностика?
12. Объясните понятие «специфическая профилактика».
13. Какие животные восприимчивы к вирусу бешенства?
14. Как исследуют патологический материал животных, зараженных ящуром?
15. Устойчив ли вирус бешенства во внешней среде? Какие типы вируса бешенства вы знаете?

ЛИТЕРАТУРА

1. Асонов, Н. Р. Микробиология : учебник для студентов вузов по спец. «Зоотехния» / Н. Р. Асонов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1997. – 352 с.
2. Биологические препараты для диагностики, лечения и профилактики болезней животных : учеб.-метод. пособие / А. А. Вербицкий, А. А. Гласкович, В. А. Герасимчик, М. Ф. Николаенко. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – Ч. 1. Болезни бактериальной и грибковой этиологии. – 32 с.
3. Вирусология. Практикум : учеб. пособие для студентов учреждений высшего образования по спец. «Ветеринарная медицина» / Р. Б. Корочкин [и др.] ; ред. Р. Б. Корочкин. – Минск : ИВЦ Минфина, 2013. – 256 с.
4. Г л а с к о в и ч, М. А. Использование натуральных биокорректоров для регулирования кишечного микробиоценоза цыплят-бройлеров : монография / М. А. Гласкович, Е. А. Капитонова. – Горки : БГСХА, 2011. – 256 с.
5. Иммунология : учеб. пособие для студентов вузов биол. спец. / П. А. Красочко [и др.] ; ред. П. А. Красочко, Н. Д. Лисова. – Минск : Аверсэв, 2005. – 128 с.
6. Лабораторная диагностика бактериальных инфекций сельскохозяйственных и домашних животных / А. А. Вербицкий, В. В. Максимович, А. А. Солонко [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – 20 с.
7. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных бактериальной этиологии / В. С. Прудников, В. В. Максимович, Н. Н. Андросик [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2000. – 20 с.
8. Максимович, В. В. Диагностика инфекционных болезней бактериальной этиологии : учеб.-метод. пособие / В. В. Максимович, В. Ф. Багрецов. – Витебск, 1996. – 42 с.
9. Микробиология и иммунология : учеб. пособие для студентов с.-х. вузов по спец. «Ветеринарная медицина», «Зоотехния» : в 2 ч. / А. А. Солонко [и др.] ; под ред. А. А. Гласкович, П. А. Красочко. – Минск : Пион, 2002. – Ч. 1: Общая микробиология и иммунология. – 248 с.
10. Микробиология : учеб.-метод. пособие / Т. В. Соляник, А. А. Гласкович, А. А. Вербицкий, М. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2009. – 115 с.
11. Практикум по общей микробиологии : учеб. пособие для студентов вузов по спец. «Ветеринарная медицина» / А. А. Солонко [и др.] ; под ред. А. А. Гласкович. – Минск : Ураджай, 2000. – 280 с.
12. Практикум по частной микробиологии : учеб. пособие для студентов с.-х. вузов по спец. «Ветеринарная медицина» / А. А. Солонко [и др.]. – Минск : Ураджай, 2000. – 250 с.
13. Практикум по частной микробиологии : учеб. пособие / А. А. Солонко, А. А. Гласкович, В. Н. Алешкевич [и др.] ; под ред. А. А. Гласкович. – Минск : Ураджай, 2000. – 250 с.
14. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 1: Общая микробиология. – 82 с.
15. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 2: Основы иммунологии. – 82 с.

16. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 3: Частная микробиология. – 126 с.
17. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 4: Основы санитарной микробиологии. – 85 с.
18. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 5: Основы вирусологии. – 46 с.
19. Соляник, Т. В. Микробиология : метод. указания по изучению дисциплины и задания для контрольной работы / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – 151 с.
20. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / под ред. А. А. Конопаткина. – М. : Колос, 1984. – 544 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Тема 1. Микробиология как наука. История микробиологии. Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории. Микробиологическая лаборатория и ее оборудование. Методы исследований, применяемые в микробиологической практике. Правила работы с микроскопами	7
Тема 2. Морфология микроорганизмов. Структура микробной клетки. Техника приготовления препаратов для микроскопического исследования. Методы фиксации препаратов. Простые методы окрашивания	23
Тема 3. Сложные методы окрашивания микроорганизмов	36
Тема 4. Питательные среды и их классификация. Методика приготовления искусственных питательных сред для выращивания микроорганизмов. Методы стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и инструментов	47
Тема 5. Техника посева микроорганизмов на различные питательные среды. Режимы культивирования микроорганизмов	60
Тема 6. Учет культуральных свойств микроорганизмов на различных питательных средах. Методы получения чистых культур	67
Тема 7. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы. Антибиототики. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам	75
Тема 8. Биохимические свойства микроорганизмов	84
Тема 9. Возбудители брожения и продукты их жизнедеятельности	93
Тема 10. Методы лабораторной диагностики бактериальных и вирусных инфекций	97
Тема 11. Возбудители сибирской язвы, туберкулеза, бруцеллеза. Принципы лабораторной диагностики, специфической профилактики, лечения	103
Тема 12. Возбудители пастереллеза животных, мастита крупного рогатого скота, рожи свиней	124
Тема 13. Возбудители болезней молодняка сельскохозяйственных животных – эшерихиозов, сальмонеллезов, пневмонии (септицемии)	136
Тема 14. Патогенные анаэробы – возбудители ботулизма, столбняка, злокачественного отека, фузариобактериоза	151
Тема 15. Возбудители микозов – дерматомикозов, плесневых микозов	164
Тема 16. Возбудители микотоксикозов – стахиботриотоксикоза, фузариотоксикоза, дендродохиотоксикоза	177
Тема 17. Вирусы бешенства, ящура. Методы их лабораторной диагностики ...	188
ЛИТЕРАТУРА	198