



ЛАНЬ®
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
МОСКВА
КРАСНОДАР
2017

**Р. Г. ГОСМАНОВ,
А. К. ГАЛИУЛЛИН,
А. Х. ВОЛКОВ,
А. И. ИБРАГИМОВА**

МИКРОБИОЛОГИЯ

Издание второе, стереотипное

Рекомендовано Учебно-методическим объединением вузов России по образованию в области технологии сырья и продуктов животного происхождения в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринарно-санитарная экспертиза»



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ • МОСКВА • КРАСНОДАР
2017

ББК 28.4

М 59

М 59 Микробиология: Учебное пособие. — 2-е изд., стер. — СПб.: Издательство «Лань», 2017. — 496 с. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-1180-1

В первой части учебного пособия изложены основы общей и частной микробиологии: история возникновения; предмет и задачи; принципы систематики; морфология и строение микроорганизмов; физиология и генетика бактерий; действие факторов внешней среды на микроорганизмы и экология микроорганизмов; морфология; тинкториальные и биохимические свойства возбудителей болезней; методы лабораторной диагностики, а также средства специфической профилактики и лечения. Во второй части представлены основы учения об инфекции и иммунитете; понятия об использовании вакцин, сывороток и диагностических препаратов. В третьей части даны лабораторные занятия по общей и частной микробиологии.

Учебное пособие предназначено для направления подготовки «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

ББК 28.4

Рецензент

Р. Х. РАВИЛОВ — доктор ветеринарных наук, профессор,
ректор КГАВМ им. Н. Э. Баумана.

Обложка

Л. А. АРНДТ

*Охраняется Законом РФ об авторском праве.
Воспроизведение всей книги или любой ее части
запрещается без письменного разрешения издателя.
Любые попытки нарушения закона
будут преследоваться в судебном порядке.*

- © Издательство «Лань», 2017
- © Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин,
А. Х. Волков, А. И. Ибрагимов, 2017
- © Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ — аденозиндифосфорная кислота
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
БГКП — бактерии группы кишечной палочки
ВИЭВ — Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии
ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
ГПС — глюкозопептонная среда
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕД — единица действия
КМА — количество мезофильных аэробов
МАФАнМ — мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы
Мкм — микрометр
МПА — мясопептонный агар
МПБ — мясопептонный бульон
МПЖ — мясопептонный желатин
МПШБ — мясопептонный печеночный бульон
МПШГГА — мясопептонный печеночно-глюкозный глицериновый бульон
нм — нанометр
НТД — научно-техническая документация
ОМЧ — общее микробное число
ПДК — предельно допустимые концентрации
ПГГА — печеночно-глюкозный глицериновый агар
ПГГБ — печеночно-глюкозный глицериновый бульон
РА — реакция агглютинации
РНК — рибонуклеиновая кислота
РП — реакция преципитации
РСЖ — реакция связывания комплемента
СПМ — санитарно-показательные микроорганизмы
СПФ — свободное от патогенных микробов животное
ЦНС — центральная нервная система
Вас. — Bacillus
Bact. — Bacterium
BCG — Bacterium Calmett-Guerin
Cl. — Clostridium
Ig — Immunoglobulin

ПРЕДИСЛОВИЕ

Основа подготовки будущих ветеринарно-санитарных врачей, ветсанэкспертов по микробиологии и иммунологии, — это теоретические и практические знания о многообразии мира микробов, их роли в общебиологических процессах, в патологии человека и животных, в порче сырья животного и растительного происхождения.

В настоящее время дефицит литературы по микробиологии для студентов, обучающихся по специальности «Ветеринарно-санитарная экспертиза», диктует необходимость обобщить все имеющиеся сведения в виде доступного учебного пособия.

Предлагаемая книга позволит студентам ознакомиться с вопросами профилактики инфекционных болезней людей и животных, вызываемых микроорганизмами бактериальной и грибковой этиологии, правилами консервирования, хранения, транспортировки и реализации готовой продукции.

Учебное пособие состоит из трех разделов. В первом разделе приведена история возникновения микробиологии как науки; строение и распространение микроорганизмов в природе; их систематика и классификация; представлены морфологические, культуральные и биохимические свойства зооантропонозных возбудителей; методы бактериологической и серологической диагностики, а также средства специфической профилактики и лечения. Во втором изложены основы учения об инфекции и иммунитете, а также серологические методы диагностики возбудителей особо опасных инфекций. Третий раздел

содержит лабораторные занятия, дающие практические навыки по общей и частной микробиологии.

Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности 110501 — «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Для лучшего усвоения студентами методов лабораторной диагностики инфекционных болезней человека и животных теоретический материал по конкретным темам был связан с методическими разработками лабораторных занятий.

В книге также изложены сведения по отдельным теоретическим вопросам (учение об инфекции, иммунохимические методы исследований, методика выявления спор и капсул и др.), которые не входят в учебную программу, однако, по мнению авторов, будут полезны студентам.

Согласно государственной образовательной программе в учебное пособие включены материалы по возбудителям особо опасных инфекционных болезней, правила личной профилактики и техники безопасности.

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ
**ОСНОВЫ ОБЩЕЙ
И ЧАСТНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ**

ГЛАВА 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

1.1. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ, ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология (от *греч.* *micros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение) — наука о мельчайших микроскопических организмах, названных микроорганизмами или микробами. Микробиология по существу является отраслью биологии и изучает микроскопические организмы. Раньше биологию традиционно разделяли по основным типам изучаемых организмов на ботанику, зоологию и микробиологию.

Объектами изучения микробиологии являются бактерии (прокариоты), простоорганизованные эукариоты, вирусы, риккетсии и микоплазмы. В современной микробиологии сформировались более узкие дисциплины для изучения отдельных типов объектов, выделенных по признаку возрастающей сложности организации, начиная от макромолекул и генов до клеток, многоклеточных организмов и популяций. Такое подразделение способствует выявлению универсальных принципов, общих для всех живых систем. Микробиология в настоящее время стала самостоятельной областью раздела биологии благодаря огромному значению, которое имеют микроорганизмы в восполнении энергетических ресурсов, чистоты окружающей среды, изготовлении молочнокислых продуктов и в борьбе с инфекционными болезнями человека, животных и растений. Микробы в большинстве своем являются одноклеточными организмами, генетически связанными с растительным и животным миром. Для изучения этих организмов разработаны новые оригинальные методы исследования.

Микробиология изучает морфологию, систематику, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов; их взаимоотношения с окружающей средой и значение в жизни человека, животных и всей биосферы.

История возникновения микробиологии. Предположения о том, что брожение, гниение и заразные (инфекционные) болезни — результат воздействия неизвестных организмов, были озвучены Гиппократом (460–377 гг. до н. э.), Лукрецием (96–55 гг. до н. э.), Вергилием (70–19 гг. до н. э.). Итальянский врач Д. Фракастро (1478–1553) и астроном А. Кирхер (начало XVII в.) выдвинули теорию о том, что болезни от человека к человеку передаются мельчайшими живыми существами, но доказать этого не смогли.

Однако становление микробиологии как науки стало возможным только после изобретения микроскопа. Первым, кто увидел и описал микроорганизмы, был голландский натуралист Антони ван Левенгук (1632–1723), который сконструировал прибор (микроскоп), дававший увеличение до 300 раз. С помощью микроскопа он рассматривал воду, различные настои, кровь, зубной налет и многое другое. В рассматриваемых объектах он обнаружил мельчайшие существа, названные им живыми зверьками (анималькулями), которые имели шаровидные, палочковидные и извитые формы. Книга «Тайны природы, открытые А. Левенгуком» (1695) привлекла внимание ученых многих стран и побудила их к изучению микроорганизмов. Однако исследования в течение многих десятилетий сводились лишь к описанию различных форм микроорганизмов.

Период с конца XVII в. до середины XIX в. вошел в историю как описательный, или *морфологический*, так как роль микроорганизмов в природе, жизни животных и человека оставалась неясной, но тем не менее он создал условия для перехода к следующему — *экспериментальному периоду*.

Экспериментальный период связан с именем выдающегося русского ученого М. М. Тереховского (1740–1796), который изучал действие различных физических и химических факторов на микроорганизмы. Анализируя условия появления живых организмов в различных настоях, он пришел к выводу, что их образование в средах, подвергнутых кипячению, не происходит. Благодаря этим открытиям возникла *асептика* и *антисептика* в хирургии.

Одним из первых «охотников за микробами» в Европе и России был русский врач Данило Самойлович. Во время эпидемии чумы в Москве в 1771 г. он пытался найти возбудителя этого заболевания. Обладая качествами бесстрашного исследователя, он заразил себя гноем больных, чтобы доказать возможность предохранения людей от чумы с помощью прививок. Умер Самойлович во время эпидемии чумы в Таганроге.

Идея предохранения людей от заразных болезней не была новой. Так, за много лет до работ Пастера английский врач Э. Дженнер (1749–1823) разработал метод предохранительных прививок от оспы. Заражая людей коровьей оспой, он фактически разрешил проблему борьбы с оспой человека. Однако сущность этого метода была разгадана Л. Пастером только через 100 лет.

Бурное развитие микробиологии начинается со второй половины XIX в. благодаря работам выдающегося французского ученого-химика Луи Пастера (1822–1895), который открыл сущность природы брожения и положил начало *физиологическому периоду*. В то время в науке господствовала теория Ю. Либиха, утверждавшая, что брожение и гниение — результаты окислительных процессов, обусловленных действием ферментов, и они представляют собой чисто химическое явление без участия микроорганизмов. Л. Пастер доказал, что причина брожения и гниения — микроорганизмы, вырабатывающие различные ферменты. Каждый бродильный процесс обусловлен жизнедеятельностью специфического возбудителя, гниение вызывается группой гнилостных бактерий и т. д. Изучая маслянокислое брожение, Пастер установил, что *Vac. butyricum* развивается при отсутствии кислорода, и тем самым открыл явление анаэробнозиса.

С именем Л. Пастера связано решение вопроса о самопроизвольном зарождении жизни. Он экспериментально доказал, что при абсолютной стерильности питательных растворов и исключении последующего загрязнения в них невозможно появление микробов и развитие гниения. Жизнь возникает тогда, писал Л. Пастер, когда в питательный раствор микроорганизмы проникают извне.

В 1865 г. Л. Пастер установил, что порча вина и пива обусловлена попаданием в сусло микроорганизмов или диких дрож-

жей, и для предупреждения их размножения предложил нагревать вино и пиво до 100°C. Этот способ получил название *пастеризация*.

В 1868 г. Л. Пастер установил, что болезнь шелковичных червей пембину вызывают особые микроорганизмы. Для борьбы с ними он предложил простой и эффективный метод: всех больных червей (гусениц) — производителей шелка — уничтожать и заменять здоровыми бабочками.

Занимаясь изучением природы заразных болезней, Пастер открыл возбудителя холеры кур, стафилококки, стрептококки, возбудителя рожи свиней, установил этиологию сибирской язвы. Он обнаружил важное свойство патогенных микроорганизмов — способность к ослаблению вирулентности. На этой основе им была разработана оригинальная теория ослабления (аттенуации) вирулентности микроорганизмов. Пастер успешно использовал ослабленные культуры для прививок против инфекционных болезней. Культуры микроорганизмов с ослабленной вирулентностью были названы *вакцинами*, а метод прививок — *вакцинацией*. Л. Пастер предложил методы получения вакцин против холеры кур, сибирской язвы, бешенства.

В результате культивирования бацилл сибирской язвы при температуре 42,5°C Л. Пастер получил низковирулентный вакцинный штамм.

Вершиной научной деятельности Л. Пастера явилось исследование по борьбе с бешенством. В 1885 г. Л. Пастеру впервые удалось получить ослабленную культуру возбудителя бешенства. В качестве исходного материала для изготовления вакцины он использовал мозг кролика, зараженный суспензией из мозга собаки, погибшей от бешенства. Путем многократных пассажей через мозг кролика был получен возбудитель со стабильными свойствами (*virus fixe*), который послужил исходным материалом для изготовления антирабических (*rabies* — бешенство) вакцин. Опыты предохранения собак от заражения бешенством с помощью таких вакцин дали хорошие результаты. Однако испытать вакцину на человеке Л. Пастер долго не решался, и тут помог случай, когда на лечение привезли ребенка, сильно искусанного бешеной собакой. В результате иммунизации данной вакциной ребенок остался жив.

Успех Л. Пастера стал сенсацией. В Париж из разных стран начали прибывать люди, искушенные бешеными животными. Одной из первых стран, где было налажено производство антирабической вакцины по методу Л. Пастера и прививки для предупреждения бешенства, была Россия. В июне 1886 г. И. И. Мечников и Н. Ф. Гамалея организовали в Одессе Пастеровскую станцию. С этого времени в микробиологии наступил *иммунологический период*. Основателями иммунологии были И. И. Мечников (1845–1916), Эмиль Беринг (1854–1917) и Пауль Эрлих (1854–1915).

Идеи Л. Пастера и его учеников (Э. Ру, А. Иерсен, Э. Дюкло, Ш. Шамберлан, Г. Рамон, Ж. Борде, А. Кальмет и др.), теоретические и практические результаты их исследований приобрели всеобщее признание. Благодаря этим исследованиям были открыты и изучены возбудители многих заразных болезней, разработаны средства и методы лечения и профилактики.

В 1888 г. в Париже был открыт Пастеровский институт, остающийся до настоящего времени крупнейшим центром микробиологических исследований. Имя Л. Пастера присвоено многим научно-исследовательским институтам в различных странах мира и в нашей стране.

Дальнейшее развитие микробиологии связано с внедрением молекулярной биологии, т. е. с *молекулярно-генетическим периодом* (1941–1950). Исследование микроорганизмов открыло новую эпоху не только в генетике, но и в естествознании вообще. Использование генетических методов исследований при изучении биохимии бактерий позволило установить законы наследственности и изменчивости у высших форм. После установления наследственности и изменчивости бактерий стало возможным говорить о том, что общие закономерности эволюции, открытые Ч. Дарвином для животных и растений, являются общими и для микроорганизмов.

У микроорганизмов был выявлен целый ряд ранее не известных механизмов передачи наследственной информации — трансформация, трансдукция, конъюгация и др.

Благодаря развитию молекулярной биологии и генетики в период 1960–1970 гг. появилась такая наука, как биотехнология. *Биотехнологический период* связан, прежде всего, с открытием антибиотиков в 1940–1950-е гг., созданием крупномас-

штабных микробиологических предприятий, с проведением широкой селекции микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, а также с бурным развитием производства кормовых дрожжей, белково-витаминных концентратов и аминокислот для животных. Немаловажное значение в становлении данного периода сыграли большие достижения в генетической инженерии, которые коренным образом изменили представление в селекции микроорганизмов продуцентов вакцин или иных биопрепаратов.

Ценный вклад в новую науку — микробиологию — наряду с Л. Пастером внес немецкий ученый Р. Кох (1843–1910). Им разработаны методы микробиологических исследований. Впервые в практике лабораторных исследований были предложены плотные питательные среды (мясопептонный желатин и мясопептонный агар), что позволило выделять и изучать чистые культуры микробов. Кох разработал методы окраски микробов анилиновыми красителями, применил для микроскопии иммерсионную систему и конденсор Аббе, а также микрофотографирование, научно обосновал теорию и практику дезинфекции. Также он начал изучение микроорганизмов как возбудителей заразных болезней. Р. Кох выявил возбудителя сибирской язвы (1876), туберкулеза (1882), холеры человека (1883), изобрел туберкулин. Им была создана школа бактериологов, к которой принадлежат такие ученые, как Э. Беринг, Ф. Леффлер, Р. Пффейфер, Г. Гаффки и др.

На ранних этапах развития микробиологии большое значение имели работы Л. С. Ценковского, который в 1856 г. опубликовал классический труд «О низших водорослях и инфузориях». Ученый на основе принципа аттенуации микробов, разработанного Л. Пастером, разработал свой вариант вакцинного штамма бацилл сибирской язвы. Его I и II вакцины против сибирской язвы (1883) многие годы использовались в ветеринарной практике.

Большую роль в развитии микробиологии сыграл гениальный русский ученый И. И. Мечников (1845–1916). К числу важнейших достижений в области микробиологии относятся его исследования патогенеза холеры человека, сифилиса, туберкулеза, возвратного тифа. Он является основоположником учения о микробном антагонизме, ставшего основой для развития науки об антибиотикотерапии.

И. И. Мечников создал новое направление в микробиологии — иммунологию. Это учение о невосприимчивости организма к инфекционным болезням (иммунитет). Также им была создана фагоцитарная теория иммунитета, раскрыта сущность воспаления как защитной реакции организма. Необходимо отметить, что многие ученики Мечникова впоследствии стали крупными микробиологами, среди них — Н. Ф. Гамалея, А. М. Безредка, Л. А. Тарасевич, Г. Н. Габричевский и др.

Научные работы Н. Ф. Гамалеи (1859–1949) были посвящены изучению инфекции и иммунитета, изменчивости бактерий, профилактике сыпного тифа, холеры, туберкулеза и других болезней. В 1893 г. он впервые наблюдал и описал явление спонтанного лизиса бактерий под влиянием неизвестного в то время агента — бактериофага. В 1886 г. совместно с И. И. Мечниковым принимал активное участие в создании первой в России Одесской бактериологической станции. Также им была введена в практику прививка от бешенства.

Г. Н. Габричевский (1860–1907) первым начал читать курс бактериологии в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова. В 1893 г. им был выпущен учебник «Медицинская микробиология», а в 1895 г. создан первый в Москве бактериологический институт, с первых дней работы которого Г. Н. Габричевский приступил к изготовлению противодифтерийной сыворотки, впоследствии широко применяемой во врачебной практике. Ученый также установил значение гемолитического стрептококка как возбудителя скарлатины, изучил его роль в патологии человека, разработал и предложил вакцину для профилактики данного заболевания.

Создателем нового направления в микробиологии — вирусологии — является русский ученый Д. И. Ивановский (1864–1920). В 1892 г. им был открыт возбудитель мозаичной болезни табака, получивший название фильтрующегося вируса.

Основоположник общей и почвенной микробиологии С. Н. Виноградский (1856–1953) разработал накопительные питательные среды, выделил и изучил азотфиксирующие и нитрифицирующие бактерии почвы, установил роль микробов в круговороте азота, углерода, фосфора, железа и серы, а также доказал существование бактерий, самостоятельно синтезирующих органические ве-

щества, что позволило выявить новый тип питания микробов — аутотрофизм.

Большой вклад в историю развития ветеринарной микробиологии в целом внесли отечественные микробиологи Е. М. Земмер, И. И. Щукевич, И. М. Садовский, А. В. Дедюлин, А. В. Конев, А. А. Раевский и многие другие, а в развитие ветеринарной микробиологии по изучению патогенеза, разработке диагностики и средств специфической профилактики многих инфекционных болезней животных — Г. М. Андреевский, П. Н. Андреев, А. М. Владимиров, С. В. Вышелесский, Д. С. Руженцев, М. Г. Тартаковский.

В 1891 г. одновременно и независимо друг от друга русские ученые Х. И. Гельман и О. И. Кальнинг изготовили маллеин для аллергической диагностики сапа.

К. А. Михин (1872–1946) — один из основоположников ветеринарной микробиологии в нашей стране — открыл возбудителя лептоспироза крупного рогатого скота, разработал методику изготовления фармолвакцины против сальмонеллеза телят и противоколибактериозной сыворотки, а также методику гипериммунизации лошадей для получения сыворотки против сибирской язвы. Данный ученый также является автором первого в стране учебника «Курс частной микробиологии для ветеринарных врачей и студентов».

С развитием ветеринарной науки росла и совершенствовалась школа ветеринарных микробиологов, давшая нашей стране плеяду ученых-микробиологов, таких как Н. Н. Гинсбург, Я. Е. Коляков, В. В. Кузьмин, И. И. Кулеско, В. Т. Котов, С. Г. Колесов, Я. Р. Коваленко, Н. В. Лихачев, С. Я. Любашенко, С. А. Муромцев, М. Д. Польшковский, И. В. Поддубский, А. А. Поляков, А. Х. Саркисов, П. С. Соломкин, М. К. Юсковец, Р. А. Цион, П. А. Триленко и др., внесших значительный вклад в изучение возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, создание новых и совершенствование известных вакцин, иммунных сывороток и диагностических препаратов, что позволило ликвидировать многие инфекционные болезни и обеспечить эпизоотическое благополучие в стране.

Необходимо отметить, что большинство ученых, помимо научных изысканий, также участвовали в ликвидации эпизоотии, работали в опасных очагах инфекций.

Отраслевые направления микробиологии. В зависимости от условий окружающей среды, экологических особенностей, различных взаимоотношений, сложившихся в процессе эволюции, практических потребностей человека, наука о микроорганизмах в своем развитии дифференцировалась на следующие специальные дисциплины.

Общая микробиология, изучающая морфологию, физиологию, генетику, общие закономерности развития и жизнедеятельности микроорганизмов, их роль в превращении веществ в природе, образовании биологически активных соединений, широко применяемых в различных областях народного хозяйства, а также вопросы систематики и классификации мира микробов. Данная дисциплина является базовой для всех других отраслевых разделов микробиологии.

Промышленная микробиология изучает микроорганизмы, используемые в различных отраслях промышленности с целью получения пищевых продуктов, спирта, ферментов, аминокислот, витаминов, антибиотиков, кормового белка и других биологически активных веществ, а также разрабатывает способы предохранения продуктов и сырья от порчи микроорганизмами. Необходимо также отметить, что с помощью микроорганизмов на предприятиях микробиологической промышленности в больших объемах получают продукты микробиологического синтеза.

Космическая микробиология изучает влияние космических условий на жизнедеятельность микроорганизмов.

Геологическая микробиология изучает роль микроорганизмов в образовании и разложении руд, извлечении и получении из них металлов, образовании полезных ископаемых, круговороте наиболее важных биогенных элементов.

Сельскохозяйственная микробиология изучает микроорганизмы, участвующие в формировании почвенных структур, повышении плодородия почв, создании бактериальных удобрений, вызывающие болезни сельскохозяйственных культур (фитопатогенные), а также разрабатывает меры борьбы с ними и, кроме того, методы консервирования кормов с помощью микробов (силосование и др.).

Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни человека, и разрабатывает

методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней специальными препаратами (сыворотки, вакцины и др.), а также условия сохранения патогенных микробов в окружающей среде, пути и механизмы их распространения.

Ветеринарная микробиология изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни сельскохозяйственных, промысловых и диких животных, птиц, рыб, пчел, а также зооантропонозные инфекции, общие для животных и человека, кроме того, роль микроорганизмов в животноводстве (микрофлору кормов, желудочно-кишечного тракта животных) и технологию получения продуктов животного происхождения.

Из ветеринарной микробиологии в самостоятельные дисциплины выделились иммунология, вирусология, санитарная микробиология и микология.

Иммунология изучает закономерности проявления, механизмы и способы управления иммунитетом, антигены и антитела, иммунологическую толерантность, вопросы аллергии, диагностики, специфической профилактики и терапии.

Вирусология изучает микроорганизмы, не имеющие клеточной структуры, — вирусы, их природу, химический состав, взаимоотношения с клеткой хозяина, механизмы внутриклеточного паразитизма и др. Вирусы поражают людей, животных, растения, а также бактерии и другие микроорганизмы. Вместе с тем их используют как одну из основных моделей в генетике и молекулярной биологии. Вирусология обладает собственными методами исследования.

Санитарная микробиология занимается вопросами выживания патогенных и условно-патогенных микробов в окружающей среде, разрабатывает методы санитарно-бактериологического контроля объектов окружающей среды (воды, воздуха, почвы, навоза, кормов) и методы их оздоровления.

Микология (от греч. *Mukes* — гриб и *logos* — наука) — наука о микроскопических грибах, получившая свое начало во второй половине XVIII в., в настоящее время сформировалась полностью.

Ветеринарная микробиология тесно связана с медицинской своими задачами и методами их решений, но применительно к животным.

Задачи микробиологии. Важной социальной задачей микробиологии по специальности «Ветсанэкспертиза» является охрана здоровья человека при работе с сырьем, а также безопасность людей, использующих товары, приготовленные из сырья растительного и животного происхождения.

Связь микробиологии с другими науками. Своим успешным развитием микробиология обязана в первую очередь достижениям физики и химии, позволившим расшифровать некоторые особенности обмена веществ. Благодаря электронной микроскопии была изучена тонкая структура бактериальной клетки. Химия дала много новых аналитических методов исследования, что позволило пересмотреть механизмы и сущность энергетического обмена, биосинтеза ряда веществ. В свою очередь, оценим вклад микробиологии в генетику, биохимию, молекулярную биологию.

Использование микроорганизмов в качестве генетических и биохимических объектов открыло новую эпоху в естествознании. С достижениями в микробиологии связано решение многих теоретических проблем общей биологии и медицины и их практического применения. На микроорганизмах впервые была установлена роль ДНК в передаче наследственной информации, доказаны сложная структура гена и взаимосвязь мутационных процессов со структурой ДНК. Изучение жизнедеятельности микроорганизмов выявило их способность (высокую активность) к синтезу весьма ценных соединений, имеющих большое практическое значение.

В настоящее время в РФ существует большое количество научно-исследовательских институтов, проблемных лабораторий, развита сеть республиканских, областных, межрайонных и районных ветеринарных лабораторий. Микробиологические проблемы изучают как на кафедрах микробиологии в ветеринарных вузах, так и на ветеринарных факультетах сельскохозяйственных вузов страны. Микробиологические методы исследования применяют в ряде смежных дисциплин: эпизоотологии, ветеринарно-санитарной экспертизе, акушерстве, хирургии, фармакологии и др. Овладение столь обширными микробиологическими знаниями и методами необходимо для формирования профессионального мышления ветеринарного врача широкого профиля.

Систематика микроорганизмов. Все живые организмы распределяются в трех сферах обитания: животный мир, растительный и мир простейших. На нашей планете насчитывается до 3 млн видов животных и около полумиллиона видов растений.

В 1886 г. немецкий биолог Э. Геккель предложил выделить все одноклеточные микроорганизмы (простейшие, грибы, бактерии), у которых отсутствует дифференцировка на органы и ткани, в отдельное царство — *Protista* (протисты, первосущества), включив в него организмы, во многих отношениях занимающие промежуточное положение между растениями и животными. В дальнейшем с учетом строения клеток протисты были подразделены на две четко разграниченные группы — высшие и низшие.

У *высших* протистов строение клетки сходно со строением растительных и животных клеток, это — *эукариоты*, т. е. микроорганизмы, имеющие истинное ядро, которое отделено от окружающей его цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной с порами. В ядре находятся 1–2 ядрышка — центры синтеза рибосомальной РНК и хромосомы — основные носители наследственной информации, состоящие из ДНК и белка. При делении хромосомы распределяются между дочерними клетками в результате сложных процессов — митоза и мейоза. Цитоплазма эукариотов содержит митохондрии, а фотосинтезирующих организмов еще и хлоропласт. Цитоплазматическая мембрана, окружающая клетку, переходит внутри цитоплазмы в эндоплазматическую сеть, есть также мембранная органелла — аппарат Гольджи, как компонент цитоплазмы.

К эукариотам отнесены микроскопические водоросли (кроме синезеленых) и микроскопические грибы (плесени и дрожжи).

К *низшим* отнесены протисты, клетки которых по строению существенно отличаются от всех других организмов (бактерии и синезеленые водоросли), это — *прокариоты* (доядерные).

Прокариотические клетки устроены проще. В них нет четкой границы между ядром и цитоплазмой, отсутствует ядерная мембрана, ДНК не образует структур, похожих на хромосомы эукариот, поэтому у прокариот не происходят процессы митоза и мейоза. У большинства прокариот отсутствуют внутриклеточные органеллы, ограниченные мембранами, а также митохондрии и хлоропласт, рибосомы свободно лежат в цитоплазме.

К прокариотическим организмам отнесены синезеленые водоросли, бактерии, риккетсии, актиномицеты и микоплазмы.

В настоящее время описано более 3,5 тыс. видов бактерий, но их число постоянно возрастает. Разобраться в этом удивительном многообразии можно благодаря систематике.

Систематика — наука о классификации организмов, их эволюционном родстве и взаимоотношениях друг с другом.

Классификация — это распределение множества организмов на классы, группы (таксоны) на основе учета их общих признаков; составная часть систематики.

Таксономия — теория классификации, систематизации живой природы.

Термины «систематика» и «таксономия» часто употребляют как синонимы, однако систематика представляет собой более широкое понятие.

Систематика включает в себя три самостоятельные составные части: классификацию, идентификацию и номенклатуру.

Классификация, как уже упоминалось, — это распределение организмов на таксономические группы.

Идентификация — это определение принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону (классу, порядку, семейству, роду, виду и пр.).

Номенклатура — это свод правил присвоения названий таксонам и список этих названий; заключительный этап систематики после классификации, выполняет функции «информационного языка» и до некоторой степени независима от классификации.

До второй половины XIX в. классификация основывалась на внешних проявлениях организма — *фенотипах* (морфология, подвижность, окраска по Граму, наличие капсулы, способность образования эндоспор, культурально-биохимические свойства и некоторые другие признаки), так как наследственная структура организмов — *генотипы* — была еще недоступна для исследования.

Следовательно, *традиционная* или *классическая систематика*, основанная на изучении внешних, проявляющихся в процессе жизнедеятельности признаков, — целиком *фенотипическая систематика (феносистематика)*. Расширение доступной исследователю информации о фенотипе и использование

вычислительной техники для ее обработки привело к появлению нового направления — численной (числовой, или нумерической) таксономии.

Возникновение (в 1950-х гг.) и успешное развитие молекулярной биологии способствовали становлению нового направления в систематике, названного отечественными учеными геносистематикой.

Геносистематика, в отличие от феносистематики, занимающейся изучением множества признаков, базируется на исследовании только одного вещества — наследственного материала клетки (ДНК), в котором запрограммировано индивидуальное развитие организма. Иначе говоря, геносистематика — это раздел систематики, предметом исследования которого являются генотипы, или генетические программы, созданные в процессе биологической эволюции на Земле. Разница между феносистематикой и геносистематикой заключается в том, что они принципиально отличаются объектами исследования.

В классификации родственных микроорганизмов используют следующие таксономические категории: царство (*regnum*), отдел (*divisio*), секция (*section*), класс (*classis*), порядок или отряд (*ordo*), семейство (*familia*), род (*genus*), вид (*species*). Названия микроорганизмам присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

В микробиологии, как и в биологии, для обозначения видов бактерий принята двойная (бинарная) номенклатура, предложенная еще в XVIII в. К. Линнеем. Согласно номенклатуре, название рода пишется латиницей с прописной буквы. Первое слово обозначает родовую принадлежность микроба (какой-либо морфологический признак, фамилию ученого, открывшего этот микроб, и др.), второе — название вида — пишется со строчной буквы. Видовое название микроорганизма, как правило, представляет собой производное от существительного, дающего описание либо цвета колонии, либо источника обитания микроорганизма, вызываемого им процесса или болезни и других отличительных признаков. Например, *Escherichia coli* указывает, что микроб открыл Эшерих, *coli* — обитатель кишечника; *Bacillus anthracis* — микроб образует споры, *anthracis* — возбудитель сибирской язвы; *Azotobacter* — микроорганизм, фиксирующий атмосферный азот.

Основной номенклатурной единицей служит *вид*. В 1973 г. В. Д. Тимаков дает ему следующее определение: «Вид — это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам, обладающих наследственно закрепленной способностью вызывать в среде естественного обитания качественно определенные специфические процессы». Вид подразделяют на подвиды или варианты. Если при изучении выделенных бактерий обнаруживают отклонение от типичных видовых свойств, то такую культуру рассматривают как подвид. Существуют также и инфраподвидовые подразделения, обусловленные отклонением какого-либо небольшого наследственного признака: антигенного — *серовар*, биохимического — *биовар*, отношения к фагам — *фаговар*, патогенности — *патовар* и др. Введение в слова общей части «вар» (вариант) рекомендовано во избежание возможных недоразумений, ранее применявшийся термин «тип» использован для обозначения номенклатурного типа.

В микробиологии используют следующие термины: «чистая и смешанная культура», «клон» и «штамм». Под термином «культура» понимают микроорганизмы, выращенные на плотной или в жидкой питательной среде в условиях лаборатории. Культуру микроорганизмов из особей одного вида называют *чистой культурой*. *Смешанной культурой* называют смесь неоднородных организмов, выросших в питательной среде при посеве исследуемого материала (молока, почвы, воды, патологического материала) или при попадании в питательную среду, засеянную одним видом микроба, еще и другого вида микроба из внешней среды. *Клон* — это культура, полученная из одной популяции клетки определенного вида микроба. *Штамм* — чистая культура определенного вида микроба, выделенная из того или иного объекта и отличающаяся от эталонного штамма незначительными изменениями свойств (например, чувствительностью к антибиотикам, ферментацией углеводов и др.).

В микробиологии существуют два различных подхода к систематике, обуславливающие два вида классификации. В основе первого лежит идея создания естественной (филогенетической) классификации прокариот, т. е. построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами микробов и историю их эволюционного развития. Вто-

рой подход к систематике преследует практические цели и служит для идентификации, т. е. установления принадлежности микроорганизма к определенному виду. Это искусственная классификация (традиционная). Современные системы классификации микроорганизмов по существу все искусственные. На их основе созданы определители для идентификации того или иного микроорганизма: «Определитель бактерий и актиномицетов» Н. А. Красильникова (1949), «Определитель микробов» Р. А. Циона (1948) и др. В определителе бактерий Д. Х. Берджи, девятое издание которого вышло в 1997 г., все прокариотические микроорганизмы объединены в царство *Procarvotae* (Murray, 1968), которое подразделяется на четыре отдела. Они, в свою очередь, делятся на секции, классы, порядки, семейства, роды, виды.

1.2. ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И СТРОЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Бактерии (от *греч.* bacterion — палочка) — микроорганизмы с прокариотным типом строения, преимущественно представлены одноклеточными формами. Термин «прокариоты» равнозначен термину «бактерии».

Бактерии не видимы невооруженным глазом. Для их изучения используют световые и электронные микроскопы. Клетки бактерий измеряют в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм}$), элементы тонкого строения — в нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-3} \text{ мкм}$). Предел разрешения светового микроскопа составляет $0,2 \text{ мкм}$, а современных моделей электронных микроскопов — $0,15\text{--}0,3 \text{ нм}$. Средние размеры прокариот составляют $0,5\text{--}3 \text{ мкм}$. Наиболее стабильны размеры кокков — $0,5\text{--}2 \text{ мкм}$. Палочковидные формы обычно длиной $2\text{--}10$ и шириной $0,5\text{--}1 \text{ мкм}$, мелкие палочки соответственно $0,7\text{--}1,5$ и $0,2\text{--}0,4 \text{ мкм}$.

В 1967 г. Адлер описал мини-клетки, которые в десять раз меньше исходных бактерий, не содержат хромосомную ДНК, а только плазмидную. Среди бактерий существуют гиганты длиной 125 мкм и более. Размеры спирохет составляют от $0,2\text{--}0,75$ до $5\text{--}500 \text{ мкм}$.

По форме клеток бактерии подразделяют на три основные группы: шаровидные, или кокки, палочковидные и извитые.

Кокки (от *греч.* kokkos — зерно, *лат.* coccus — ягода) имеют сферическую форму правильного шара, эллипса, боба, ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают: микрококки, или монококки, стафилококки, диплококки, стрептококки, тетракокки и сарцины.

Микрококки (от *лат.* micrococcus — маленький) делятся в разных плоскостях и располагаются одиночно, парами или беспорядочно; являются сапрофитами; обитают в почве, воде, воздухе. Например, *Micrococcus luteus*.

Стафилококки (от *греч.* staphyle — виноградная гроздь) делятся в различных плоскостях и располагаются несимметричными гроздьями, иногда одиночно, парами; есть сапрофиты и патогенные. Например, *Staphylococcus aureus*.

Диплококки (от *греч.* diploos — двойной) делятся в одной плоскости, попарно соединяясь. Например, *Azotobacter chroococcum*.

Стрептококки (от *греч.* streptos — цепочка) делятся в одной плоскости, располагаются в виде цепочки; встречаются одиночные и парные клетки; сапрофиты и патогенные. Например, *Streptococcus pyogenes*.

Тетракокки (от *греч.* tetra — четыре) делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях; располагаются по четыре.

Сарцины (от *лат.* sarcio — связываю) делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют правильные пакеты по 8–16 клеток и более; сапрофиты; встречаются в воздухе, почве, кишечнике животных и человека. Например, *Sarcina ureae*.

Палочковидные бактерии. Самая многочисленная группа прокариот. Они имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму тела с округлыми, тупыми или заостренными концами. Палочковидные формы подразделяют на две группы: не споровые палочки — *бактерии* (*Bacterium*) и палочки, образующие споры, — *бациллы* (*Bacillus*). При этом палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, называют *кlostридиями* (*Clostridium*) — веретенообразные.

В зависимости от взаимного расположения клеток палочковидные бактерии подразделяют на *одиночные* и *бессистемные скопления*, *диплобактерии* и *диплобациллы* (располагаются попарно), также *стрептобактерии* и *стрептобациллы* (формы, образующие длинные или короткие цепочки). Сапрофиты

и патогенные виды. Например, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*.

К палочковидным формам также относят коринебактерии и фузобактерии.

Коринебактерии (от греч. *corune* — булава) — прямые или изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах; сапрофиты, патогенны для животных и человека. Например, *Corynebacterium pseudotuberculosis* и др.

Фузобактерии — длинные, толстые, с заостренными концами палочки; патогенные виды — возбудитель некробактериоза (*Fusobacterium necrophorum*).

Извитые бактерии обладают спиральной симметрией; к ним относятся вибрионы, спираиллы и спирохеты.

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

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

Спирохеты (*spirochaeta* — извитые бактерии; от греч. *speira* — изгиб и *chaite* — длинные волосы) прокариоты спирально извитой формы. У них существует два типа витков: первичные — образованные изгибами протоплазматического цилиндра, и вторичные — представляющие изгибы всего тела. Спирохеты — эластичные спиралевидные длинные клетки, состоящие из осевой нити (аксистиля), цитоплазмы с рибосомами и включениями нуклеоида, мезосом, цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Тонкая эластичная клеточная стенка включает в себя наружную липопротеидную мембрану и не сплошной слой пептидогликана. Осевая нить растянута на всю длину клетки, выполняет локомоторную и опорную функции и представляет собой пучок из 2–150 аксиальных (опорных) фибрилл, состоящих из аминоксахара кутина. Число и величина фибрилл у разных видов не одинаковы. Протоплазматический цилиндр упакован спиралевидно и окружен аксиальными фибриллами, прикрепляющимися к дискам на его концах. Фибриллы заключены в перипласте (между цитоплазматической

мембраной и клеточной стенкой). Движение спирохет происходит за счет активного сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра. Формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное.

Размножаются спирохеты поперечным делением. В неблагоприятных условиях они могут переходить в цисту — укороченную и свернутую в спираль, окруженную прочной оболочкой клетки.

По морфологии (размерам, числу и форме завитков), числу осевых фибрилл, характеру движения, типу биологического окисления, экологии, патогенности в пределах группы спирохеты дифференцируются на спирохеты, кристиспиры, трепонемы, боррелии и лептоспиры.

Спирохеты и кристиспиры обитают в открытых водоемах, иле, сточных водах; для позвоночных не патогенны. Кристиспиры — гигантские прокариоты (28–150 мкм), спирально изогнутые, с плоской зернистой килевидной мембраной (крита) вдоль тела клетки. Число фибрилл — более 100.

Трепонемы — спиралевидные эластичные бактерии размером от 0,1–0,5 до 5–20 мкм; осевая нить состоит из одной или четырех фибрилл; четко выражены равномерные или неравномерные завитки; подвижны. Типовой вид — *Treponema pallidum*.

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

Лептоспиры — спиралевидные бактерии диаметром 0,1–0,25 и длиной 6–30 мкм, формирующие около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков и 1–2 вторичных, придающих клетке форму букв G, S, C. Осевая нить состоит из двух фибрилл. Главный тип движения — вращательно-поступательный. Например, *Leptospira interrogans*.

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

Микробы чрезвычайно пластичны и легко изменяются под влиянием различных внешних факторов, таких как температура, питательная среда, концентрация солей, кислотность, продукты метаболизма, дезинфицирующие агенты, лекарственные препараты, ингибиторы организма.

Многолетние исследования микробиологов убедительно показывают, что особи первых поколений грибов, развивающиеся в свежей, благоприятной для их роста среде, отличаются от особей последующих поколений. Особенно часто проявляется полиморфизм у бактерий при культивировании их в искусственных средах. В результате ответных реакций бактерий на воздействие физических и химических свойств питательного субстрата образуются различные по форме и величине клетки: сильно увеличенные, раздутые, шаровидные, колбовидные или нитевидные, а также фильтрующиеся формы. Такие морфологические изменения связаны либо с нарушением синтеза оболочки бактерий, либо механизма регуляции их клеточного деления. В зависимости от степени воздействия на микробную клетку изменения могут быть генетическими (наследственными) и фенотипическими (ненаследственными).

Способность микробов изменяться под влиянием различных факторов окружающей среды учитывают в лабораторной диагностике инфекционных болезней, при изготовлении биологических препаратов, предназначенных для профилактических и лечебных целей.

Строение бактериальной клетки. Прокариоты имеют сложное строго упорядоченное строение и обладают принципиальными особенностями субмикроскопической организации и химического состава.

Структурные компоненты бактериальной клетки делятся на основные и временные. Основные структуры — это клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид; временные — капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерий; у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки).

Термин «оболочка» используют для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки; цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

Клеточная стенка. Важный структурный элемент бактериальной клетки находится между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий — это внешняя оболочка клетки. Она имеется у всех прокариот за исключением микоплазм и L-форм бактерий и выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме, а у многих видов патогенных бактерий токсична за счет поверхностных антигенов или несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. Клеточная стенка пронизана порами, через которые происходит транспорт экзотоксинов и других экзобелков бактерий. Толщина клеточной стенки 10–100 нм, она содержит от 5 до 50% сухого вещества клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *пептидогликан*, или *муреин* (от лат. *murus* — стенка), — опорный полимер сетчатой структуры, образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки. Пептидогликан имеет основную цепь (остов), состоящую из чередующихся остатков N-ацетил-глюкозамина и N-ацетил-мурамовой кислоты, соединенных р-1,4-гликозидными связями, идентичные тетрапептидные боковые цепочки, прикрепляющиеся к молекулам N-ацетилмурамовой кислоты, и короткие поперечные пептидные мостики, связывающие полисахаридные цепи. Два типа связей (гликозидные и пептидные), между субъединицами пептидогликана, придают этому гетерополимеру структуру молекулярной сети. Остов пептидогликанового слоя у всех видов бактерий одинаков, а тетрапептидные белковые цепочки и пептидные (поперечные) различны.

Все бактерии в зависимости от окраски по Граму подразделяют на две группы: *грамположительные* и *грамотрицательные*. В 1884 г. Х. Грам предложил метод окраски, который был использован для дифференциации бактерий. Сущность данного метода состоит в том, что грамположительные бактерии, образующие прочный комплекс с генцианвиолетом в присутствии йода, не обесцвечиваются этанолом и поэтому не воспри-

нимают дополнительный краситель фуксин, оставаясь окрашенными в фиолетовый цвет. У грамотрицательных бактерий этот комплекс легко вымывается из клетки этанолом и после дополнительного нанесения фуксина окрашивается в красный цвет. Некоторые бактерии положительно окрашиваются только в стадии активного роста. Способность прокариот окрашиваться по методу Грама или обесцвечиваться этанолом обусловлена спецификой химического состава и ультраструктурой их клеточной стенки. Содержание пептидогликана — основного компонента клеточной стенки — у грамположительных бактерий составляет 50–90%, а у грамотрицательных — 1–10%. Структурные микрофибриллы пептидогликана у грамотрицательных бактерий связаны менее компактно, поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий, поэтому фиолетовый комплекс генцианвиолета и йода при действии этиловым спиртом у них вымывается быстрее.

Клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, она массивна, и ее толщина составляет 20–100 нм. Для нее характерно наличие тейхоевых кислот, которые связаны с пептидогликаном и представляют собой полимеры трехатомного спирта — глицерина или пятиатомного спирта — рибита, остатки которых соединены фосфодизэфирными связями. Тейхоевые кислоты связывают ионы магния и участвуют в транспортировке их в клетку. В составе клеточной стенки также присутствуют в небольших количествах полисахариды, белки и липиды.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, ее толщина составляет 14–17 нм. Внутренний слой — пептидогликан — образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку. Пептидогликан содержит только мезодиаминопимелиновую кислоту и не имеет лизина. Внешний слой клеточной стенки — наружная мембрана — состоит из фосфолипидов, липопротеина и белков. Белки основы (матричные) наружной мембраны прочно связаны с пептидогликановым слоем. Одна из их функций заключается в формировании в мембране гидрофильных пор, через которые происходит диффузия молекул массой до 600, иногда 900 мкм. Матричные белки, кроме того, выполняют функцию рецепторов для некоторых фагов. Липополисахарид (ЛПС) клеточных стенок грамотрицательных бактерий состоит из липида А

и полисахарида. ЛПС, токсичный для животных, получил название эндотоксина. Тейхоевые кислоты не обнаружены.

Структурные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий ограничены от цитоплазматической мембраны и разделены промежутком, называемым периплазмой или периплазматическим пространством.

Протопласты и сферопласты. Протопласты — это формы прокариот, полностью лишенные клеточной стенки, обычно образуемые грамположительными бактериями. Сферопласты — бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой с сохранением элементов наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных бактерий и значительно реже у грамположительных. Они образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана пенициллином в среде с соответствующим осмотическим давлением.

Протопласты и сферопласты имеют сферическую или полисферическую форму и в 3–10 раз крупнее исходных клеток. В обычных условиях в результате осмотического лизиса они погибают, а при повышенном осмотическом давлении способны некоторое время жить, расти и даже делиться. Протопласты при снятии фактора, разрушающего пептидогликан, как правило, отмирают, но могут превращаться в L-формы; сферопласты легко реверсируют в исходные бактерии, иногда трансформируются в L-формы или гибнут.

L-формы бактерий — это фенотипические модификации, или мутанты бактерий, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. Таким образом, L-формы — бактерии с дефектной клеточной стенкой. Свое название они получили в связи с тем, что были выделены и описаны в институте Листера в Англии в 1935 г. Они образуются при воздействии L-трансформирующих агентов — антибиотиков (пенициллина, полимиксина, бацитрацина, стрептомицина), аминокислот (глицина, метионина, лейцина и др.), фермента лизоцима, ультрафиолетового и рентгеновского излучения. В отличие от протопластов и сферопластов L-формы обладают относительно высокой жизнеспособностью и выраженной способностью к репродукции. По морфологическим и культуральным свойствам они резко отличаются от ис-

ходных бактерий, что обусловлено утратой клеточной стенки и изменением метаболической активности.

L-формы бактерий *полиморфны*. Встречаются элементарные тельца размером 0,2–1 мкм (минимальные репродуцирующие элементы), шары — 1–5, большие тела — 5–50, нити — до 4 мкм и более. Клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран и миелоноподобные структуры. Вследствие дефекта клеточной стенки они осмотически неустойчивы и их можно культивировать только на специальных средах с высоким осмотическим давлением. При фильтрации они проходят через бактериальные фильтры.

Различают *стабильные* и *нестабильные* L-формы бактерий. Стабильные полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами, и крайне редко реверсируют в исходные бактериальные формы. Нестабильные могут обладать элементами клеточной стенки, в чем они проявляют сходство со сферопластами; при отсутствии фактора, вызвавшего их образование, реверсируют в исходные клетки.

Процесс образования L-форм получил название L-трансформации, или L-индукции. Данной способностью обладают практически все виды бактерий, в том числе и патогенные (возбудители бруцеллеза, туберкулеза, листерии и др.).

L-формам отводится большое значение в развитии хронических рецидивирующих инфекций, носительстве возбудителей, длительной персистенции их в организме. Доказана трансплацентарная инвазивность элементарных телец L-форм бактерий.

Инфекционный процесс, вызванный L-формами бактерий, характеризуется атипичностью, длительностью течения, трудно поддается химиотерапии.

Цитоплазматическая мембрана и ее производные. Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) — полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8–15% ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. На ультратонких срезах в электронном микроскопе выявлено ее трехслойное строение — два ограничивающих осмиофильных слоя толщиной 2–3 нм каждый и один осмиофобный центральный слой толщиной 4–5 нм.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой белково-липидный комплекс, состоящий из 50–75% белков и 15–20% липидов. Основная часть мембранных липидов (70–90%) представлена фосфолипидами. Она построена из двух мономолекулярных белковых слоев, между которыми расположен липидный слой в виде двух рядов правильно ориентированных молекул липидов. Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера клетки, контролирует поступление питательных веществ и выход продуктов метаболизма наружу. Ее субстратспецифические ферменты — пермеазы, которые осуществляют активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

Ферменты цитоплазматической мембраны катализируют конечные этапы синтеза мембранных липидов, компонентов клеточной стенки, капсулы и экзоферментов. На мембране локализованы ферменты окислительного фосфорилирования и ферменты транспорта электронов, ответственные за синтез энергии.

В процессе роста клетки цитоплазматическая мембрана образует многочисленные инвагинаты, формирующие внутрицитоплазматические мембранные структуры. Локальные инвагинаты мембраны получили название *мезосом*. Они хорошо выражены у грамположительных бактерий, хуже у грамотрицательных и плохо у риккетсий и микоплазм.

Связь между мезосомой и хромосомой бактерии называется *нуклеоидосомой*. Интегрированные с нуклеоидом мезосомы принимают участие в кариокинезе и цитокинезе микробных клеток, обеспечивая распределение генома после окончания репликации ДНК и последующее расхождение дочерних хромосом. Мезосомы, как и цитоплазматическая мембрана, представляют собой центры дыхательной активности бактерий, поэтому их иногда называют аналогами митохондрий. Мезосомы увеличивают рабочую поверхность мембран, возможно, выполняют только структурную функцию, производя разделение бактериальной клетки на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов, у патогенных бактерий они обеспечивают транспортировку белковых молекул экзотоксинов.

Цитоплазма. Содержимое бактериальной клетки ограничено цитоплазматической мембраной, которая состоит из *цито-*

золя гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты РНК, ферменты, продукты метаболизма, и *структурных элементов* — рибосом, внутрицитоплазматических мембран, включений и нуклеоида.

Рибосомы — органоиды, осуществляющие биосинтез белка, которые состоят из белка и РНК, они соединены в комплекс водородными и гидрофобными связями. Бактериальные рибосомы — гранулы диаметром 15–20 нм — имеют константу седиментации 70S и образованы из двух рибонуклеопротеидных субъединиц: 30S и 50S. Одна бактериальная клетка содержит от 5000 до 50 000 рибосом, которые посредством РНК объединены в полисомы — агрегаты, состоящие из 50–55 рибосом, обладающие высокой белоксинтезирующей активностью.

В цитоплазме бактерий присутствуют (не постоянно) различного типа *включения*: твердые, жидкие и газообразные, с белковой мембраной или без нее. Значительная их часть представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживают гликоген и крахмалоподобное вещество гранулезу, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. Липиды накапливаются в клетках в виде гранул и капелек жира, к ним относятся окруженные мембраной гранулы поли- β -оксимасляной кислоты, резко преломляющие свет и хорошо различимые в световом микроскопе. Выявляются у бациллы антракса и аэробных спорообразующих сапрофитных бактерий. Микобактерии в качестве запасных веществ накапливают воск. В клетках некоторых коринебактерий, спирилл и других содержатся гранулы волютина, образованные полифосфатами. Данные гранулы играют роль фосфатного депо. К включениям, окруженным мембраной, также относятся газовые *вакуоли*, или *аэросомы*, которые способствуют снижению удельной массы клеток; встречаются они у водных прокариот.

Нуклеоид — это ядро у прокариот. Он состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1–1,6 мм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или *генофор*. Нуклеоид не отделен от остальной части клетки мембраной, т. е. у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки, гистоны отсутствуют. Хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий — на мезосоме. Бактериальная хромосома реплицируется полуконсервативным способом: родительская двойная спираль ДНК раскручивается и на матрице каждой полинуклеотидной цепи собирается новая комплементарная цепочка. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивает рост цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро — дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. Это связано с тем, что деление бактериальной клетки происходит после завершения цикла репликации молекулы ДНК и формирования дочерних хромосом. В нуклеоиде сосредоточен основной объем генетической информации бактериальной клетки.

Кроме нуклеоида в клетках многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы — *плазмиды*, представленные небольшими кольцевыми молекулами ДНК, способными к автономной репликации.

Капсула представляет собой слизистый слой над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают видимую в световом микроскопе *макрокапсулу* толщиной 0,2 мкм и *микрокапсулу* толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при электронной микроскопии или выявляемую химическими и иммунологическими методами. Макрокапсулы (истинную капсулу) образуют *B. anthracis*, *Cl. perfringens*, микрокапсулу — некоторые штаммы *E. coli*. Капсула не является обязательной структурой бактериальной клетки, потеря ее не приводит к гибели бактерии. Известны бескапсульные мутанты бактерий, например вакцинный штамм сибирской язвы СТИ-1.

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетеро-

полисахариды (энтеробактерии и др.). У некоторых видов бацилл капсулы построены из полипептида. Так, в состав капсулы *B. anthracis* входит полипептид d-глутаминовой кислоты, а в микрокапсулы микобактерий туберкулеза млекопитающих входят гликопептиды, представленные сложным эфиром трегалозы и миколовой кислоты (корд-фактор).

Синтез капсулы — сложный видоспецифический процесс у различных прокариот. Принято считать, что биополимеры капсулы синтезируются на наружной поверхности цитоплазматической мембраны и выделяются на поверхность клеточной стенки в определенных специфических участках.

Существуют бактерии, синтезирующие слизь на поверхности клеточной стенки в виде бесструктурного слоя полисахаридной природы. Слизистое вещество, окружающее клетку, по толщине часто превосходит диаметр последней. У сапрофитной бактерии лейконостока наблюдается образование одной капсулы для многих особей. Такие скопления бактерий, заключенные в общую капсулу, называют *зооглеями*.

Капсула — полифункциональный органоид, выполняющий важную биологическую роль. Служит местом локализации капсульных антигенов, определяющих вирулентность, антигенную специфичность и иммуногенность бактерий. Утрата капсулы у патогенных бактерий резко снижает их вирулентность, например у бескапсульных штаммов бациллы антракса. Капсулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм — от фагоцитоза. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату.

В ветеринарной микробиологии выявление капсулы используют в качестве дифференциального морфологического признака возбудителя сибирской язвы.

Для окрашивания капсул применяют следующие специальные методы: Романовского — Гимза, Гинса — Бурри, Ольта, Михина и др.

Микрокапсулу и слизистый слой определяют серологическими реакциями (РА), антигенные компоненты капсулы идентифицируют при помощи иммунофлюоресцентного метода (РИФ) и РДП.

Жгутики. Органы движения бактерий имеют вид тонких, длинных, нитевидных структур белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10–20 мкм. Нить жгутика (фибрилла) — полый спиральный цилиндр диаметром 12–20 нм. У вибрионов и протей нить окружена футляром толщиной 35 нм.

Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. *Крюк* — изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным тельцем и жесткой нитью жгутика. *Базальные тельца* — сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не жизненно важные структуры бактериальной клетки. Так, у возбудителя столбняка в старых культурах преобладают клетки без жгутиков. Наличие жгутиков у бактерий зависит от температуры их выращивания.

Количество жгутиков (1–50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. Поэтому в связи с этим выделяют следующие группы жгутиковых бактерий: *монотрихи* — бактерии с одним полярно расположенным жгутиком; *амфитрихи* — бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах; *лофотрихи* — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки; *перитрихи* — бактерии с множеством жгутиков, расположенных на всей ее поверхности. Бактерии, не имеющие жгутики, называют *атрихиями*.

Жгутики типичны для палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное перемещение в жидкой среде и более медленное по поверхности твердых субстратов. Скорость движения монотрихов и лофотрихов достигает 50 мкм/с, амфитрихи и перитрихи движутся медленнее и обычно за одну секунду перемещаются на расстояние, равное размерам их клетки.

Бактерии передвигаются беспорядочно, однако они способны к направленным формам движения — таксисам, в зависимости от внешних стимулов. Реагируя на различные факторы окружающей среды, бактерии за короткое время локализуются в оптимальной зоне обитания. Таксис может быть положи-

тельным и отрицательным. Принято различать: хемотаксис, аэротаксис, фототаксис, магнитотаксис. *Хемотаксис* происходит в результате разницы в концентрации химических веществ в среде; *аэротаксис* — кислорода; *фототаксис* — интенсивности освещения; *магнитотаксис* обусловлен способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.

Спириллы и спирохеты не имеют жгутиков и перемещаются за счет изменения конфигурации тела или совершая вращательные движения.

Пили (фимбрии, ворсинки) — прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3–25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Они образованы специфическим белком — пилином, берут начало от цитоплазматической мембраны, встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только под электронным микроскопом. На поверхности клетки может быть от 1–2, 50–400 пилей до нескольких тысяч.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют *фимбриями*. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы.

Половые пили на поверхности бактерий в процессе конъюгации выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

Пили общего типа располагаются перитрихально (кишечная палочка) или на полюсах (псевдомонады), на одной бактерии их могут быть сотни. Они принимают участие в слипании бактерий в агрегаты, прикреплении микробов к различным субстратам, в том числе к клеткам животного (адгезивная функция), в транспорте метаболитов, а также способствуют образованию пленок на поверхности жидких сред, вызывают агрегацию эритроцитов.

Споры (эндоспоры) бактерий — особое состояние покоящихся репродуктивных клеток, характеризующееся резким снижением уровня метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется *эндоспорой*. Способностью к образованию спор обладают преимущественно палочковидные грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium* и лишь единичные виды

шаровидных бактерий, например *Sporosarcina ureae*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

Основная функция спор — сохранение бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды. Начало спорообразования наблюдается у них при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в среде катионов калия и марганца, изменении рН, повышении содержания кислорода и др.

От вегетативных клеток споры отличаются регрессией генома, замедлением/отсутствием обмена веществ (анабиозом), минимальным объемом свободной воды в цитоплазме, повышением в ней концентрации катионов кальция и появлением дипиколиновой (пиридин-2,6-дикарбоновой) кислоты в виде Саделата, который обеспечивает состояние покоя спор и их термостойчивость.

В световом микроскопе споры видны в виде овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером от 0,8–1,0 до 1,2–1,5 мкм; они могут располагаться *центрально* (*B. anthracis*), *субтерминально* — ближе к концу (*C. botulinum*), *терминально* — на конце палочек (*C. tetani*). Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена *сердцевиной*, или *спороплазмой*, содержащей нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембраны структуры. Спороплазма окружена *цитоплазматической мембраной*, к которой прилегает зачаточный *пептидогликановый слой*, затем специфическим для спор массивным слоем *кортекса*, или *коры*. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора окружена *многослойной оболочкой*. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается *экзоспорум*.

Спорообразование (споруляция) — один из сложнейших процессов дифференцировки бактериальной клетки под контролем комплекса специальных генов — *спорулонов*. У многих бацилл во время образования спор синтезируются полипептидные антибиотики, подавляющие рост вегетативных клеток.

Процесс образования спор включает в себя ряд последовательных стадий.

Подготовительная, во время которой изменяется метаболизм, завершается репликация ДНК и происходит ее конденса-

ция. Клетка содержит два или более нуклеоида, один из них локализуется в спорогенной зоне, остальные в цитоплазме спорангия. Одновременно синтезируется дипиколиновая кислота.

Во время *стадии предспоры* со стороны цитоплазматической мембраны вегетативной клетки происходит врастание двойной мембраны, или септы, отделяющей нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы (спорогенная зона), в результате чего образуется проспора, окруженная двумя мембранами.

На *стадии образования* палочек между мембранами споры образуется зачаточный пептидогликановый слой, над которым затем откладывается толстый пептидогликановый слой кортекса и вокруг его наружной мембраны формируется споровая оболочка.

Созревание споры — это стадия завершения образования всех структур споры, это время, когда она приобретает термостойчивость, характерную форму и занимает определенное положение в клетке.

В благоприятных условиях споры прорастают в вегетативные клетки. Этот процесс начинается с поглощения воды и гидратации ее структур. Одновременно активизируются ферменты и резко возрастает энергия дыхания. Литические ферменты разрушают покровы споры и пептидогликан кортекса, выделяются наружу дипиколиновая кислота и соли кальция. На месте разрыва оболочки споры возникает ростовая трубка и формируется вегетативная клетка. Прорастание спор длится около 4–5 ч.

Споры бактерий устойчивы к действию высоких температур, химических соединений, в том числе органических растворителей поверхностно-активных веществ, длительное время (десятилетия, сотни лет) они могут существовать в покоящемся состоянии.

Строение актиномицетов. Актиномицеты (лучистые грибы; от *лат. actis* — луч, *mykes* — гриб) — одноклеточные грамположительные микроорганизмы, внешне сходные с мицеллярными грибами. Их тело (мицелий) состоит из тонких (0,05–2,0 мкм) и длинных гиф (нитей), способных к истинному ветвлению; гифы могут быть прямыми или спиралевидными и имеют единую с основной нитью оболочку и протопласт. На плотных средах актиномицеты образуют субстратный, врастающий в среду воздушный мицелий. Кроме мицеллярных встречаются палочковидные

и кокковидные формы. Строение актиномицетов аналогично грамположительным бактериям, клеточная стенка содержит пептидогликан и не имеет в своем составе, как микроскопические грибы, хитина и целлюлозы. Размножаются они при помощи спор (конидий): из отдельных ветвей зрелых гиф воздушного мицелия образуются спороносцы, которые в результате фрагментации или сегментации превращаются в споры. При благоприятных условиях они прорастают в вегетативные клетки.

Для актиномицетов характерен гетеротрофный тип питания и аэробный (окислительный) тип получения энергии, существуют и анаэробы. Отдельные виды синтезируют пигменты: розовый, желтый, синий и др. Обитают они преимущественно в почве, присутствуют в воде, на растениях, коже и слизистых оболочках животных; разлагают органические субстраты, в том числе недоступные для других микроорганизмов. Играют важную роль в круговороте веществ и энергии, образовании почвы и ее плодородии. Многие актиномицеты служат продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов. Большинство из них сапрофиты, но есть патогенные. К ним относится *Actinomyces bovis* — возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота.

Строение риккетсий. Риккетсии (по имени американского ученого Н. Т. Ricketts) — мелкие внутриклеточные бактерии, выделенные в отдельную группу, вызывающие у животных и человека специфические болезни — риккетсиозы. Риккетсии — короткие с закругленными концами палочки размером от 0,2–0,3 до 0,3–1,0 мкм, располагающиеся одиночно или парами, необразующие, неподвижные, грамтрицательные, размножающиеся поперечным делением. Имеют клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, рибосому, ядерный аппарат, синтезируют белок, ДНК, РНК, АТФ, ферменты промежуточного обмена. Цитоплазматическая мембрана риккетсий отличается высокой проницаемостью, что обусловлено их паразитическим образом жизни. Они не растут на обычных питательных средах, для их культивирования применяют куриные эмбрионы или культуры клеток животных. Они чувствительны к действию температуры и химических факторов. Патогенные виды у животных вызывают Q-лихорадку, гидрперикардит инфекционный, риккетсиозный моноцитоз, риккетсиозный кератоконъюнктивит и другие болезни.

Строение хламидий. Хламидии (*Chlamydiales*) — внутриклеточные облигатные паразиты, отличающиеся от других микроорганизмов циклом развития и механизмом адаптации к внутриклеточным условиям. Относятся к семейству *Chlamydiaceae*, вызывают инфекционные болезни животных и человека. Они не производят собственную АТФ, поэтому зависят от энергетического обмена клетки. В результате подавления хламидиями синтеза клеточной ДНК энергия клетки переключается на синтез ДНК и протеина хламидий. Поражающие животных хламидии обладают тканевым тропизмом, но им не свойственна хозяиноспецифичность, что способствует их распространению среди разных видов. В цитоплазме клеток, зараженных хламидиями, при световой микроскопии обнаруживают инфекционные элементарные частицы — округлые, диаметром 250–350 нм, которые образуются в конце внутриклеточного цикла развития хламидий и содержат РНК и ДНК. В начале инфекции в цитоплазме формируется матрикс, затем появляются крупные элементарные частицы, у которых отсутствует нуклеоид, а оболочка не сформирована. Они неустойчивы во внешней среде, чувствительны *in vitro* к антибиотикам и не обладают инфекционностью. К концу инфекционного процесса появляются мелкие зрелые элементарные частицы, которые имеют ДНК-содержащий нуклеоид и плотную трехслойную оболочку, они устойчивы во внешней среде, не чувствительны *in vitro* к антибиотикам, обладают инфекционными свойствами. В клетках, зараженных хламидиями, при световой микроскопии обнаруживают также цитоплазматические включения, которые окрашиваются по Романовскому. Хламидии обладают видовыми и групповыми антигенами.

Они довольно устойчивы во внешней среде. Выделяясь с фекалиями животных, сохраняют жизнеспособность в течение нескольких месяцев. 2% -ный хлорамин, 3% -ный лизол, 5% -ный NaOH разрушают хламидий в течение 3 ч, а нагревание до 70°C — в течение 15 мин. Выделяют и культивируют хламидии на куриных эмбрионах, белых мышах, в культуре клеток. Быстрая идентификация основана на обнаружении цитоплазматических включений и элементарных частиц. Инфекции, вызванные хламидиями, установлены у птиц (орнитоз), у крупного рогатого скота (энцефалит, энцефаломиелит, гепатопатия,

пневмония, вульвовагинит, аборт, гранулезный энтерит, орхит, полиартрит), у мелкого рогатого скота (аборт, пневмония, кератоконъюнктивит, полиартрит), у свиней (bronхопневмонии, перикардит). Хламидии поражают также лабораторных и диких животных, у которых отмечено бессимптомное носительство.

Строение микоплазм. Микоплазмы — мельчайшие свободноживущие прокариоты без ригидной клеточной стенки. Роль клеточной стенки выполняет трехслойная цитоплазматическая мембрана толщиной 7,5–10 нм.

Основным компонентом мембраны являются стерины; в цитоплазме располагаются рибосомы и нуклеоид. Микоплазмы не синтезируют пептидогликан. Они обладают выраженным полиморфизмом — от мелких сферических, эллипсоидных, кольцевидных клеток до нитевидных, ветвящихся мицелиальных форм размером 0,6–30 мкм. В культурах в жидких питательных средах обнаруживаются шаровидные образования размером 75–250 нм, их называют элементарными телами, они являются минимальными репродуцирующими единицами. Все микоплазмы грамотрицательны.

Строение микроскопических грибов. Грибы — многочисленная широко распространенная в природе группа организмов, включающая в себя около 100 тыс. видов. Они обитают в почве, воде, растительных и животных остатках.

Грибы (*Fungi*) — бесхлорофильные низшие эукариотические организмы, использующие для питания только органические вещества. К ним относятся плесневые грибы и дрожжи, дифференциация которых иногда затруднена, так как есть переходные формы с практически неуловимыми различиями.

Вегетативное тело грибов — *грибница*, или *мицелий*, состоит из ветвящихся нитей, называемых *гифами*. У низших одноклеточных грибов гифы не разделены поперечными перегородками (септами) на отдельные клетки, а у высших грибов мицелий септирован. Он может развиваться на поверхности и в толще субстрата, проникая внутрь. Диаметр нитей-гиф составляет 5–50 мкм и более.

Истинные грибы разделяют на шесть классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты (сумчатые), базидиомицеты, дейтеромицеты (несовершенные грибы).

Хитридиомицеты — примитивные низшие одноклеточные организмы. Мицелий отсутствует или находится в зачаточном состоянии, клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Размножение бесполое и половое. Обитают преимущественно в водоемах. Некоторые виды вызывают болезни сельскохозяйственных растений.

Оомицеты — одноклеточные (низшие) мицелиальные грибы. Функцию скелетного вещества оболочки выполняют целлюлоза и глюкан. Размножение бесполое. Обитают в водоемах. Наземные формы — паразиты высших растений.

Зигомицеты — низшие мицелиальные, многоядерные, не-септированные грибы. Клеточная оболочка содержит хитин, иногда глюкан. Размножаются спорангиоспорами, реже конидиями или половым путем. Широко распространены в верхнем слое почвы, развиваются на органических остатках растений. Используются в микробиологической промышленности с целью получения соевого сыра, спирта из картофеля, антибиотика рамицина и др. Типичными представителями этого класса являются грибы рода мукор (головчатая плесень). У мукора от одноклеточного мицелия вертикально отходят бесцветные спорангиеносцы, на верхушке которых развивается по одному спорангию. При наличии влаги оболочка зрелого спорангия легко растворяется, освобождая несколько тысяч спорангиоспор, которые затем прорастают. У животных и человека могут вызывать мукоромикозы.

Аскомицеты, или сумчатые грибы, — высшие грибы с разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение вегетативное, бесполое (при помощи конидий) и половое (сумчатая стадия). В результате полового процесса возникают *аски*, или *сумки*, внутри которых после слияния ядер половых клеток (гамет) образуются аскоспоры, обычно восемь в одном аске.

Аскомицеты широко распространены в природе (известно около 30 тыс. видов). Обитают в почве, органических субстратах, кормах и пищевых продуктах, вызывая их порчу. Паразитируют на растениях, животных, разрушают целлюлозу. Токсические виды способны вызвать микотоксикозы. Используются как продуценты антибиотиков, алкалоидов, ростовых веществ (гиббереллинов), ферментов. К аскомицетам относятся некоторые съедобные грибы — сморчок, трюфель.

Базидиомицеты — высшие грибы с многоклеточным мицелием. Специальным органом плодоношения служат базидии, которые образуют наружные споры на концах гиф в результате полового процесса. Они являются сапрофитами и факультативными паразитами хлебных злаков (головня, ржавчина). К базидиомицетам относятся также съедобные и ядовитые шляпочные грибы.

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы, — высшие грибы с многоклеточным, сильно разветвленным мицелием. Весь их жизненный цикл проходит в гаплоидной стадии, без смен ядерных фаз. Размножаются они вегетативным и бесполом путем при помощи конидий, различающихся по форме, окраске и образующихся на специализированных ветвях мицелия — конидиеносцах или пикнидах (плотных органах конидиального спороношения).

Это самый многочисленный класс, включающий в себя грибы родов аспергилл, пеницилл, стахиботрис, фузариум и др. У аспергилл, или леечной плесени, мицелий септирован, конидиеносцы одноклеточные. На их вершине формируется расширение в виде головки, от которой отходят ответвления — стеригмы — с отшнуровывающимися от них конидиями, которые могут быть окрашены в различные цвета, чаще черный, располагаются радиально и напоминают струйки воды, вытекающие из лейки.

У грибов рода пеницилл (кистевик) мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части конидиеносцы разветвлены в виде кисти руки, их последние сегменты — стеригмы — заканчиваются конидиями. Они образуют зеленый, белый и другие пигменты. Обитают в почве, сырых помещениях, кормах, пищевых продуктах.

К несовершенным грибам относят и дерматофиты — возбудители микоспории, трихофитии, фавуса (парши) животных, а также дрожжеподобные грибы родов *Candida* и *Cryptococcus*, вызывающие кандидоз и криптококкоз.

Дрожжи — безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы. Это крупные сферические или палочковидные клетки размером 3–7 мкм, однако существуют и удлиненные формы, которые могут быть и более 20 мкм.

В специальной литературе часто встречается собирательный термин «плесени» («плесневые грибы»). Это нитчатые микро-

скопические грибы разных классов, способные образовывать субстратный и воздушный мицелий, например мукор, аспергиллы, пенициллы и др.

Клетки микроскопических грибов разнообразны по форме, размерам, но имеют общие структурные элементы. Клетка всех грибов состоит из клеточной стенки, цитоплазмы с цитоплазматической мембраной и эндоплазматической сетью, митохондриями, рибосомами, включениями, вакуолями, ядром или несколькими ядрами.

Дифференциация плесневых грибов и дрожжей иногда затруднена, так как есть переходные формы, различия между которыми почти неуловимы. В качестве критерия, отличающего дрожжи от плесеней, используют способность плесеней образовывать длинные, разветвленные нити-гифы.

Клеточная стенка представляет собой многослойную оболочку из 9–10 слоев различной электронной плотности. Система микрофибрилл, встроенных в аморфный матрикс, формирует скелет клетки. Фибриллы в зависимости от видовой принадлежности могут состоять из целлюлозы, глюкона и хитина. Другие полисахариды, белки, пигменты, липиды служат цементирующими веществами, образующими химические связи с микрофибриллярной частью клеточной стенки. Наличие таких комплексов обеспечивает избирательную проницаемость для одних веществ и блокаду других.

Опорные микрофибриллы клеточной стенки и ее матрикс отличаются по механизму образования и биосинтезу. Образование фибрилл и матрикса происходит несинхронно, в первую очередь регенерируется фибриллярный остов стенки. Биосинтез этих двух частей клеточной стенки осуществляется с участием ферментов.

Процесс образования клеточной стенки происходит двумя способами: новый материал может либо внедряться в стенку поляризованно, либо равномерно накладываться по всей ее поверхности. В первом случае происходит образование цилиндрических клеток, во втором — сферических.

Клеточная стенка служит защитным приспособлением и предохраняет грибную клетку от воздействия различных факторов окружающей среды, например осмотическим барьером, обуславливающим избирательную проницаемость для различных веществ.

Она придает форму вегетативным клеткам грибов и органов размножения. На поверхности клеточной стенки и цитоплазматической мембраны локализованы ферменты, осуществляющие превращение не усвояемых клеткой (не растворимых в воде) полимеров.

В результате лизиса клеточная стенка грибов может разрушаться под воздействием ферментов, выделяемых другими клетками и образующихся в клетке самого гриба.

Основные компоненты клеточной стенки грибов — хитин, глюканы, белок и жиры. Азотистые и безазотистые полисахариды с жировыми веществами образуют растворимые и нерастворимые комплексы. Основу клеточной стенки составляют 4–6 моносахаров, соотношение которых у различных грибов незначительно варьирует. В состав полисахаридных фракций входят глюкозамин, манноза, глюкоза, ксилоза и др. Следует подчеркнуть, что состав клеточной оболочки различных клеток одного и того же гриба неодинаковый.

Протопласт — содержимое клетки, заключенное в клеточную стенку. Имеет цитоплазматическую мембрану, эндоплазматический ретикулум, одно или несколько ядер с ядрышками, а также митохондрии, рибосомы с РНК, лизосомы, аппарат Гольджи, вакуоли, пластинчатый комплекс, секреторные гранулы, а также другие структуры и различные включения.

Цитоплазматическая мембрана — тонкая трехслойная оболочка, располагающаяся непосредственно под клеточной стенкой и отделяющая ее от цитоплазмы. Цитоплазматическая мембрана обладает избирательной проницаемостью для веществ, входящих в клетку и выходящих из нее. Цитоплазматическая мембрана содержит до 40% липидов и до 38% белков. Различной формы инвагинации и ущемления цитоплазматической мембраны называются мезосомами.

Основное функциональное назначение цитоплазматической мембраны заключается в осуществлении поступления в клетку различных веществ, ферментативной переработке и выделении продуктов метаболизма. Переработанные в цитоплазматической мембране вещества поступают в протопласт клетки и участвуют в обмене веществ.

Эндоплазматический ретикулум состоит из пузырьков, канальцев и вакуолей, служащих своеобразным депо питательных веществ.

Митохондрии — многочисленные подвижные замкнутые образования эллипсоидной формы, с перегородками, покрытые одно- и двухслойной оболочкой. Считается, что митохондрии, благодаря собственной ДНК кольцевой структуры, способны к репродукции. Они окружены мембраной, на которой происходит локализация ферментов — пируватоксидазы, сукциндегидрогеназы, щелочной и кислой фосфатаз, пероксидазы и др. Митохондрии служат генераторами энергии в клетке. В зависимости от условий культивирования и физиологического состояния клетки форма митохондрий и их количество в клетке варьируют.

Рибосомы — округлые зерна рибонуклеопротеидной природы размером до 200\AA , принимают участие в синтезе клеточных белков. Их количество значительно отличается у различных видов грибов и зависит от внешних факторов, возраста культуры и др.

Аппарат Гольджи представлен группой пузырьков очень мелкого диаметра ($0,000002\text{--}0,00001\text{ мкм}$) или параллельно лежащими дисковидными пластинками. Этот органоид располагается в клетке на участке, свободном от рибосом.

Лизосомы — производные аппарата Гольджи, размещаются между клеточной оболочкой и цитоплазматической мембраной. Представляют собой зернистые образования, окруженные однослойной липопротеидной мембраной. Содержат фермент, гидролизующий белок, и выполняют функцию защиты клеток от неблагоприятного воздействия токсичных веществ экзо- и эндогенного происхождения.

Липосомы — капельки жировых веществ, окруженные однослойными мембранами.

Ядро находится в центре или на полюсах клетки. В грибных клетках могут быть одиночные и множественные ядра. Они отвечают за наследственные функции. Форма ядер округлая или удлиненная. Каждое из них окружено двухслойной пористой нуклеомембраной с ядрышком из плотных зерен и тонких фибрилл. Ядрышки содержат в составе хромосом ДНК. Через анастомозы они могут мигрировать из одной клетки в другую.

В клетках микроскопических грибов находятся многочисленные **включения**: волютин, гликоген, липиды, пигменты, миелоидные образования, соли органических кислот, аминокислоты и др. Считается, что гликоген принимает участие

в эндогенном дыхании, а волютин служит запасным питательным веществом, участвующим в энергетических процессах.

Следует отметить, что в процессе жизнедеятельности в клетках грибов накапливаются и выделяются различные продукты метаболизма — антибиотики, ферменты, токсины, витамины и др.

Все многочисленные морфологические элементы микроскопических грибов подразделяют на две группы: мицелий и споры. Они бывают различной формы и размеров. Морфологическое различие спор и мицелия служит важным дифференциальным признаком при определении вида гриба.

Мицелий представляет собой узкую круглую трубку, диаметр которой варьирует у микромицетов от одного до нескольких микрон.

Ветвящиеся трубочки — гифы, составляющие мицелий, дифференцируются на более толстые слабо разветвленные и тонкие сильноветвящиеся. Первые формируют мицелий, главным образом развивающийся на субстрате, вторые — в толще субстрата для поглощения из него питательных веществ. Такая дифференцировка особенно характерна для мицелия некоторых паразитных грибов, но встречается нередко и среди сапрофитных форм. Например, у *Rhizopus* и некоторых других имеются особые столоны, неветвящиеся и обладающие энергичным ростом.

При обильном ветвлении гифы мицелия, соприкасаясь друг с другом, могут образовывать слияния между клетками — *анастомозы*, если их много, то мицелий приобретает характерный сетчатый вид. Развитие анастомозов наблюдается у различных грибов с многоклеточным мицелием. Благодаря им возможно перемещение клеточного ядра из одной клетки в другую и переход от гаплоидного к диплоидному мицелию. Однако в большинстве случаев они осуществляют вегетативные функции и развиваются у многих форм при недостатке питания. Длина клеток мицелия колеблется от нескольких микрон до десятков и реже сотен микрон.

Мицелий окружен двухконтурной оболочкой, которая у молодых культур более нежная. В перегородках, делящих мицелий на отдельные клетки, имеются поры, через которые в процессе роста переливается цитоплазма, а с ней и питательные вещества. В клетках большое количество различных вклю-

чений; в старых цитоплазма становится зернистой из-за множества вакуолей. Молодой мицелий состоит из удлиненных прямоугольных клеток, старый — из коротких округлых или многогранных. Мицелий, имеющий перегородки, называется *септированным*. Однако у некоторых низших грибов он состоит из гиф, лишенных поперечных перегородок, и представляет собой как бы одну, сильно разветвленную гигантскую клетку с многочисленными ядрами и называется *несептированным* мицелием.

Развитие мицелия происходит следующим образом: из спору выпячивается ростковая трубочка, которая удлиняется и затем отчленяется перегородкой от средней части, включающей спору, далее происходит еще одно удлинение, после чего образуется новая перегородка, которая разделяет ростковую трубочку на дистальную (верхушечную) клетку и проксимальную (внутреннюю). В дальнейшем верхушечная клетка удлиняется и отделяет вторую, более молодую по сравнению с первой, внутреннюю клетку. Данный процесс повторяется много раз, в ходе него внутренние клетки только вытягиваются, поперечное деление происходит редко, но зато из них развиваются боковые ветви. На дистальном конце внутренней клетки образуется боковое выпячивание, принимающее цилиндрическую форму и отделяющееся затем перегородкой от производящей ее клетки. Новая клетка вырастает затем в боковую ветвь, растущую и ветвящуюся таким же образом, как и главная. Благодаря развитию ветвей на протяжении главной гифы они тем старше и сильнее развиты, чем ближе к основанию их отхождения — акропетальное ветвление.

Развитие несептированного мицелия осуществляется в целом так же, но без образования поперечных перегородок. Рост происходит на кончиках гиф, где накапливается обильная протоплазма, заполняющая весь просвет. В однородной среде, например на поверхности питательной желатины, гифы мицелия (как одноклеточного, так и многоклеточного) разрастаются равномерно и радиально, так что мицелий имеет форму круга, нарастающего с краев. Центральная часть в нем самая старая, иногда даже отмершая, а периферическая — наиболее молодая.

При общем однообразии развития мицелия, который можно назвать типичным, в отдельных случаях наблюдается ряд

специфических черт как макроскопического вида и общего характера роста, так и микроскопического строения. Макроскопический вид мицелия определяют, прежде всего, воздушные гифы. В одних случаях они формируются на самой поверхности субстрата и отчасти внутри его, и тогда мицелий имеет вид плоского, прижатого к субстрату кружка; в других случаях происходит также развитие более или менее обильных гифов, поднимающихся в воздух и придающих мицелию некоторое сходство, например с куском ваты, возвышающимся над субстратом. Характер роста может быть различным у одного и того же гриба в зависимости от влажности, питания и др. Однако ряд форм грибов имеет специфические особенности, например образование пышного воздушного мицелия — разрушителя древесины.

Цвет мицелия чаще всего бывает снежно-белый, однако с возрастом он приобретает окраску разных оттенков. Это связано с отложением пигмента в клеточных стенках и реже внутри самой клетки.

Различают *мицелий истинный* и *псевдомицелий*. Последний характеризуется тем, что отдельные клетки не связаны друг с другом и не имеют общей оболочки. Вместо истинного ветвления здесь наблюдается древовидное расположение клеток.

Для прикрепления к субстрату и извлечения из него питательных веществ в ходе эволюции у некоторых грибов сформировались специально предназначенные для этого органы: ризоиды и аппрессории, которые учитывают при идентификации грибов. *Ризоиды* — это корешкообразные, а *аппрессории* — короткие расширенные, иногда лопастеобразные выросты мицелия.

Склероции, тяжи, ризоморфы и хламидоспоры также являются видоизменениями мицелиального роста.

Склероции представляют собой септированные гифы грибов, образующие особые тела. При их формировании оболочки гиф утолщаются и приобретают темную окраску. Сильно утолщена стенка гиф наружного слоя склероция, внутри же они более тонкостенные и обычно не окрашены. Склероции — это защитные приспособительные тела, которые позволяют грибу длительное время сохраняться в окружающей среде и обеспечивают его устойчивость к воздействию различных внешних факторов: температуры, солнечных лучей и др. Зрелые склеро-

ции содержат меньше влаги по сравнению с мицелием и много запасных веществ, таких как липиды, гликогены.

Размеры склероциев колеблются от нескольких миллиметров до нескольких десятков сантиметров, а форма бывает самая разнообразная: сферическая, неправильная, в виде прямых или изогнутых рожков и др.

Структура клеток и механизм образования склероциев различны, однако их формирование происходит путем увеличения ветвления мицелия и септирования гиф. Известны два способа образования склероциев: терминальный (на концах гиф) и интеркалярный (в отдельных фрагментах главных гиф).

У многих грибов при развитии плодовых тел и некоторых вегетативных структур образуется ложная ткань — *плектенхима* (псевдопаренхима). В отличие от настоящей ткани паренхимы, возникающей в результате деления клеток в трех направлениях, плектенхима образуется путем сплетения и срастания. Если она состоит из клеток более или менее изодиаметрических, то ее называют *параплектенхимой*, если в ней присутствует явное гифообразное строение (клетки удлиненной формы), то ее называют *прозоплектенхимой*.

Мицелиальные тяжи — вегетативная структура линейно агрегированных гиф. Диаметр мицелиальных тяжей зависит от количества гиф, которые концентрируются вокруг центральной основы.

В простейшем случае небольшое количество параллельно идущих гиф склеиваются друг с другом ослизненными наружными оболочками или вступают в более прочное соединение путем формирования многочисленных коротких анастомозов. Если же тяжи массивны, то их гифы получают определенную дифференцировку. Наружные элементы бывают более тонкими, образуя как бы кору вокруг центрального толстого ствола.

Ризоморфы — более сложные по агрегации гифы, которые отличаются у различных грибов интенсивностью роста центральной гифы, протяженностью боковых ветвлений, а также степенью дифференциации ее клеток.

Наружные части у ризоморфы обычно темноокрашены и имеют определенное сходство с корнями высших растений. Они широко распространены у грибов с крупными плодовыми телами: у базидиальных, сумчатых и др.

Основное назначение мицелиальных тяжей и ризоморф состоит в обеспечении распространения грибов в субстрате и передвижении по гифам питательных веществ.

Хламидоспоры — это изменения мицелия в зрелых и старых культурах на концах или по его ходу; круглой, овальной или слегка удлинённой формы, их диаметр обычно превышает диаметр мицелия. Основная функция хламидоспор — размножение, а сохранение вида. У некоторых грибов стенка хламидоспоры двухконтурная, поверхность гладкая или шероховатая. Хламидоспоры могут возникать на концах мицелия, тогда они называются терминальными, или по ходу мицелия — интерполярные (промежуточные).

В старых культурах часто наблюдают большие скопления хламидоспор причудливой формы, напоминающей четки или ожерелье. Молодые и зрелые хламидоспоры способны прорастать. Старые клетки дегенерируют.

С помощью **спор** грибы не только размножаются, но и распространяются в окружающей среде. Этому способствует высокая устойчивость оболочек спор к воздействию агрессивных факторов. Споры подразделяют на эндоспоры, образующиеся внутри особых вместилищ — спорангиев (сумок), и экзоспоры, располагающиеся на мицелии.

У совершенных грибов споры подразделяют на ооспоры, зигоспоры, аскоспоры, базидиоспоры, эндоспоры, фиалоспоры, хламидоспоры. У несовершенных грибов в соответствии с размерами и происхождением также происходит деление спор на несколько групп. К эндоспорам, образующимся внутри мицелия путем сегментации последнего, относят таллоспоры, включающие в себя артроспоры, хламидоспоры и бластоспоры. Кроме того, для несовершенных грибов характерно образование конидий, макроконидий, алейрии (микроконидий) и гемиспор, считающихся несовершенными конидиями.

Гемиспоры более прочно связаны с мицелием и представляют собой один или два сегмента, отшнуровывающихся после поперечного деления мицелиальной нити. Форма их цилиндрическая, иногда округлая или многогранная, оболочка двухконтурная. Описание и характеристика отдельных видов микроскопических грибов представлены в III разделе «Частная микробиология».

1.3. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Белки — высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, молекулы которых построены из аминокислотных остатков, соединенных между собой ковалентными пептидными связями. Белки служат основным структурным компонентом всех клеточных мембран и выполняют следующие функции: каталитическую, двигательную, транспортную, защитную, антигенную, гормональную, запасную и др.

Белки составляют 50–80% сухого вещества микробов. Различают два основных класса: протеины и протеиды. Протеины, или простые белки (альбумины, глобулины, гистоны и др.), при гидролизе распадаются только на аминокислоты (тирозин, лейцин, триптофан и др.). Протеиды, или сложные белки, — соединения простых белков (протеинов) с небелковыми группами, нуклеиновой кислотой, полисахаридами, жироподобными и другими веществами. Отсюда различают нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды и др.

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные биологические полимеры, построенные из мононуклеотидов. Для них характерно содержание фосфора (8–10%) и азота (15–16%), а также углерода, кислорода и водорода. Нуклеиновые кислоты в бактериальной клетке могут составлять от 10 до 30% сухого вещества, в зависимости от вида бактерий и питательной среды. В большинстве своем они связаны с белками (нуклеопротеиды) и сложными радикалами клеточных структур бактерий. Нуклеиновые кислоты микробных клеток представлены в виде рибонуклеиновой (РНК) и дезоксирибонуклеиновой (ДНК) кислот. РНК преимущественно содержится в цитоплазме в мельчайших ее зернышках — рибосомах, которые осуществляют синтез ферментов. ДНК находится в ядерном веществе бактерий. ДНК — материальный носитель наследственности всех организмов, в том числе микробов. В ее структуре закодирована генетическая информация биосинтеза белков.

Углеводы в бактериях составляют 12–18% от сухого вещества. Это многоатомные спирты (сорбит, маннит, дульцит); полисахариды (гексозы, пентозы, гликоген, декстрин); моносахариды

(глюкозы, глюкуроновая кислота и др.). Углеводы выполняют энергетическую роль в метаболических процессах микробной клетки.

Липиды — истинные жиры, **липоиды** — жироподобные вещества. Ряд микробов (риккетсии, дрожжи, микобактерии, грибы) содержат липиды в значительном количестве — до 40%. У микробов других групп количество липидов по сравнению с белками невелико — не более 3–7%. Бактериальные липиды состоят из свободных жирных кислот (26–28%), нейтральных жиров, восков и фосфолипидов. Особого внимания заслуживают фосфолипиды — сложные эфиры высших спиртов и кислот, содержащие азот и фосфор. Они входят в состав токсической фракции ряда микробов.

Липиды играют роль резервных веществ и в ряде случаев могут быть использованы как исходные компоненты для синтеза белков. С ними связана кислотоустойчивость микобактерий. Они же существенно влияют на проницаемость клеточных мембран, формируют систему пограничных мембран, выполняющих различные функции по обеспечению метаболизма микробной клетки.

Химический состав спирохет, актиномицетов, микоплазм, риккетсий, микроскопических грибов в основном сходен с таковым у бактерий.

Вода является основной составной частью бактериальной клетки — 75–85%, на сухое вещество приходится всего 15–25%. Вода находится в свободном состоянии и в связанном. *Связанная* вода является структурным растворителем. *Свободная* служит дисперсионной средой для коллоидов, растворителем для кристаллических веществ, а также источником водородных и гидроксильных ионов. Например, гидролитические процессы расщепления белков, углеводов и липидов происходят в результате присоединения к ним воды, а синтез белков, пептидов из аминокислот, липидов из высших жирных кислот (ВЖК) и глицерина, крахмала, гликогена из глюкозы сопровождается выделением воды.

Основные химические элементы, содержащиеся в микробной клетке, следующие: кислород, водород, углерод и азот. В бактериях содержится по отношению к сухому веществу углерода — 45–55%, азота — 8–15, кислорода — 30, водорода — 6–8%.

Дрожжи углерода — 49%, азота — 12, кислорода — 31, водорода — 6%; микроскопические грибы углерода — 47%, азота — 5, кислорода — 40, водорода — 6%.

Кроме органогенов в микробных клетках находятся так называемые **зольные элементы** — минеральные вещества, составляющие от 3 до 10% сухого вещества. Среди них преимущественное значение имеет фосфор, который входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. Сера содержится в аминокислотах, в метионине, цистине, цистеине. Магний обеспечивает активность ряда ферментов, например протеазы. Микробы без магния не способны проявлять протеолитические свойства. Железо необходимо для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Кальций, натрий, калий, кремний, хлор тоже есть в микробных клетках. Наличие микроэлементов (молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь, никель и др.) в микробах обязательно, так как они стимулируют процессы роста и размножения.

Химические элементы образуют в микробных клетках различные органические соединения: белки, углеводы, липиды, витамины.

Ферменты — это специфические органические катализаторы белковой природы, которые, как и белки, могут быть простыми и сложными. Уреаза, пепсин, трипсин, амилаза, рибонуклеаза — простые ферменты, а каталаза, дегидрогеназы, цитохромы, пируватдекарбоксилаза — сложные.

Питание и дыхание в микробной клетке происходят с участием ферментов (энзимов), регулирующих скорость и специфичность обменных химических реакций, протекающих в микроорганизме. Присутствие незначительного количества катализатора ускоряет превращение большого количества субстрата, оставаясь при этом в свободном состоянии. Например, одна часть химозина (сычужного фермента) может свернуть до 12 млн частей молока; 1 г амилазы при определенных условиях может превратить в сахар 1 т крахмала.

Ферменты синтезируются клетками и способны действовать, даже будучи выделенными из нее, что имеет большое практическое значение. Для них характерны термолабильность и высокая специфичность действия, например фермент лактаза гидролизует лактозу, но не действует на родственные дисахариды (мальтозу, целлобиозу).

В микробной клетке может находиться большое количество ферментов, например, у аспергилла до 50. Благодаря этому микроорганизмы в состоянии осуществлять одновременно ряд различных реакций в среде, где они находятся. Принято различать экзо- и эндоферменты.

Экзоферменты не связаны со структурой протоплазмы, легко выделяются в субстрат (гидролитические ферменты), растворимы в питательной среде и проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты участвуют в основном в процессе питания: расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку и др.), т. е. подготавливают питательные вещества к усвоению их микробной клеткой.

Эндоферменты прочно связаны с бактериальной клеткой и действуют только внутриклеточно, осуществляя дальнейшее разложение питательных веществ и превращение их в составные части клетки. К таким ферментам можно отнести, например, дегидрогеназы, оксидазы.

Оптимальная температура для действия ферментов 40–50°C, для некоторых — 58–60°C, при 100°C они разрушаются. На их активность влияет и рН среды. Максимум активности ферментов у бактерий, растущих в кислой среде (ацидофилы), наблюдается при рН 4,8, а в нейтральном и близком к нейтральному значению — при рН 7,2. У бактерий, способных расти в широком диапазоне рН, реакция среды заметно не влияет на активность ферментов.

Название фермента образуется от названия вещества, на которое он действует, путем прибавления окончания — *аза*, или связано с природой катализируемой им химической реакции. Второй вариант составляет основу современной классификации и номенклатуры ферментов.

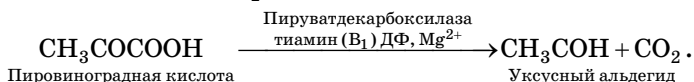
В настоящее время известно более 2 тыс. ферментов, которые были выделены в шесть классов.

1. *Оксидоредуктазы* — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Они играют большую роль в процессах получения биологической энергии. К ним относятся дегидрогеназы (алкоголь: НАД-оксидоредуктаза; сукцинат: ФАД-оксидоредуктаза; аскорбинат: O₂-оксидоредуктаза), каталаза, цитохромы, цитохромоксидазы.

2. *Трансферазы* — ферменты, катализирующие перенос отдельных радикалов, частей или целых атомных групп (не водорода) от одних соединений к другим. Например, ацетилтрансферазы переносят остатки уксусной кислоты (CH_3CO), фосфотрансферазы, или киназы, — остатки фосфорной кислоты (H_2PO_3). Известны многие другие трансферазы (аминотрансферазы, метилтрансферазы и т. д.).

3. *Гидролазы* — ферменты, катализирующие реакции гидролиза (расщепления) белков, жиров и углеводов с участием воды. Это протеолитические ферменты (или пептидгидролазы), действующие на белки или пептиды, аминолитические гидролазы глюкозидов, осуществляющие каталитическое расщепление углеводов и глюкозидов (β -фруктофуранозидаза, α -глюкозидаза, α - и β -амилаза, β -галактозидаза и др.), липолитические экстразы, катализирующие расщепление и синтез сложных эфиров (липазы, фосфатазы).

4. *Лиазы* — ферменты, катализирующие отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп или радикалов по двойным связям. Так, пируватдекарбоксилаза катализирует отщепление CO_2 от пирувиноградной кислоты:

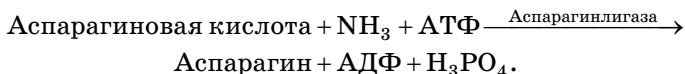


К лиазам принадлежит фермент фруктозоdifосфатлиаза, или альдолаза, расщепляющий шестиуглеродную молекулу фруктозо-1,6-дифосфата на два трехуглеродных соединения. Альдолаза активно участвует в процессе обмена веществ.

5. *Изомеразы* — ферменты, осуществляющие превращение органических соединений в изомеры. При изомеризации происходит внутримолекулярное перемещение атомов, атомных группировок, различных радикалов и т. п. Изомеризации подвергаются углеводы и их производные, органические кислоты, аминокислоты и т. д. Ферменты этой группы играют большую роль в ряде процессов метаболизма. К ним относятся триизофосфатизомераза, глюкозофосфатизомераза и др.

6. *Лиазы* (синтетазы) — ферменты, катализирующие процессы синтеза связей за счет энергии распада АТФ, образуют следующие связи: С-О; С-S; С-N; С-С.

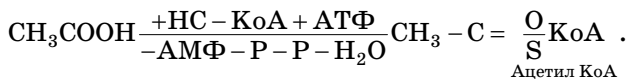
В результате образования связей из двух исходных молекул синтезируется новое органическое вещество. Например, аспарагинсинтетаза осуществляет синтез амида аспарагина из аспарагиновой кислоты и аммиака с образованием связи С–N с обязательным участием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), дающей энергию для этой реакции:



К лигазам принадлежат также карбоксилазы, катализирующие присоединение CO_2 к органическим кислотам. Например, фермент пируватдекарбоксилаза катализирует синтез щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной кислоты и CO_2 с образованием связи С–С.

Образование связи С–С катализирует фермент ацетилкоэнзим А синтетаза. В результате этой реакции образуется активная форма уксусной кислоты — ацетил КоА.

Ацетил КоА синтетаза КФ 6.2.1.1:



НС–КоА — это небелковая часть (кофермент) фермента ацетилирования.

По современной классификации каждому ферменту присвоен шифр из четырех цифр: первая обозначает класс, вторая — подкласс, третья — подподкласс и четвертая — порядковый номер фермента в данном подподклассе.

Так, шифр КФ 3.5.1.5 принадлежит карбамидамидогидролазе (уреазе), которая относится к третьему главному классу — гидролазам.

Шифр ацетил КоА синтетазы — КФ 6.2.1.1, т. е. данный фермент относится к шестому классу лигаз, ко второму подклассу (образование С– связи) и к первому подподклассу (место образования связи в карбоксильной группе), последняя цифра — порядковый номер фермента.

Скорость реакций, катализируемых ферментами, различна и зависит от количества и активности ферментов, концентрации субстрата, рН, температуры, присутствия в среде активаторов и ингибиторов.

Активность измеряют в международных единицах (МЕ). 1 МЕ соответствует количеству фермента, превращающему 1 мкМ (микромоль) (мг/М; 10^{-6} М) субстрата за 1 мин в стандартных условиях.

Разнообразные ферменты, синтезируемые клетками микроорганизмов, используют в промышленном производстве для приготовления уксусной, молочной, щавелевой, лимонной кислот, молочнокислых продуктов (сыр, ацидофилин, кумыс и пр.), в виноделии, пивоварении, силосовании. По ферментативной специфичности бактерий в лабораторных условиях осуществляют дифференциацию их на виды, разновидности.

Все реакции жизнеобеспечения, происходящие в микробной клетке и катализируемые ферментами, составляют обмен веществ, или **метаболизм**. Промежуточные или конечные вещества, образующиеся в соответствующей последовательности ферментативных реакций, в результате которых разрушается или синтезируется ковалентно-связанный скелет конкретной биомолекулы, называют *метаболитами*.

В метаболизме микроорганизмов непрерывно осуществляются два противоположных взаимосвязанных процесса: анаболизм и катаболизм, т. е. обмен конструктивный и энергетический. *Анаболизм* — это обмен веществ, протекающий с поглощением свободной энергии при расходовании сравнительно небольшого объема питательного материала; *катаболизм* — процесс выделения свободной энергии, на что расходуются огромная масса питательного субстрата.

По типу **питания** живые существа подразделяют на две группы: *голозойные* и *голофитные*. Голозойный тип питания характерен для животных (от высших до простейших), а голофитный — для микробов, так как они не имеют органов для принятия пищи и питательные вещества проникают через всю поверхность их тела.

Различают несколько механизмов питания микробных клеток. Питательные вещества могут поступать из окружающей среды в микробную клетку через клеточную стенку, капсулу, слизистые слои и цитоплазматическую мембрану. Через эти же структуры выделяются и продукты обмена, т. е. ненужные и вредные для микроорганизмов вещества. В основе механизма такого питания лежит *осмотическое* явление, основанное на

разнице концентрации питательных веществ в теле микроба и питательном растворе. Таким образом, вода и растворенные в ней питательные вещества поступают в микробную клетку. В результате биосинтеза в ней накапливается пластический материал коллоидной структуры (белки, углеводы и другие вещества), обуславливающие рост и размножение микроорганизма.

Диффузия питательных веществ в клетку может осуществляться благодаря их стереохимическому специфическому переносу. Каждый из этих процессов может протекать как активно, так и пассивно. При пассивной диффузии питательные вещества переносятся с током жидкости только при условии, что проникающее вещество способно растворяться в клеточной стенке бактериальной клетки. При активной диффузии наблюдается проникновение питательных веществ в нерастворенном виде.

При *стереохимическом* переносе питательных веществ (из внешней среды в клетку) роль переносчика выполняет белковый компонент — пермеаза. Питательные вещества среды активно транспортируются в клетку, осуществляя конструктивный и энергетический обмена.

В норме у бактериальных клеток коллоиды цитоплазмы благодаря постоянному притоку к клетке воды всегда находятся в набухшем состоянии, в результате чего цитоплазма бывает плотно прижата к оболочке. Такое явление получило название *тургора* бактериальной клетки. Величина осмотического давления у бактерий при этом не превышает $6 \cdot 10^5$ Па, у микробов, обитающих в морях и океанах, осмотическое давление достигает $6 \cdot 10^7$ Па.

Если бактерию поместить в 15–20% -ный раствор хлорида натрия или сахара (гипертонический раствор), то наступает резкое обезвоживание бактериальной клетки и протоплазматическое содержание ее отходит от оболочки. Такое явление носит название *плазмолиза*. Морфологически плазмолиз характеризуется возникновением шарообразных светопреломляющих образований в теле клетки. У различных микроорганизмов плазмолиз проявляется не в одинаковой степени. К нему особенно устойчивы сенная бацилла, стафилококки, сарцины. Легко подвергаются плазмолизу бактерии из группы пастерелл, эшерихий, сибиреязвенная бацилла, холерный вибрион и др.

Противоположный плазмолизу процесс — *плазмолиз* — происходит, если бактерии поместить в гипотонический раствор хлорида натрия или в дистиллированную воду, которая начинает проникать в бактериальную клетку, при этом ее цитоплазматическое вещество разбухает до крайних пределов и клетка приобретает форму шара. Плазмолиз, как и плазмолиз, влечет за собой гибель микробной клетки.

Различают два типа питания микробов: углеродное и азотное. По типу углеродного питания микробы принято делить на аутотрофы и гетеротрофы.

Аутотрофы, или прототрофы, (от *греч.* *autos* — сам, *trope* — пища) — микроорганизмы, способные воспринимать углерод из угольной кислоты (CO_2) воздуха. К ним относятся нитрифицирующие бактерии, железобактерии, серобактерии и др. Аутотрофы синтезируют воспринятую углекислоту в сложные органические соединения путем хемосинтеза, т. е. окислением химических соединений (аммиак, нитриты, сероводород и др.). Таким образом, аутотрофные микробы обладают способностью синтезировать необходимые им органические соединения из неорганических, таких, как угольная кислота, аммиак, нитриты, сероводород и др. Поскольку такие микробы не нуждаются в органических соединениях углерода, входящего в состав тела животных и человека, они не являются болезнетворными. Однако среди аутотрофов встречаются микробы, обладающие способностью усваивать углерод из CO_2 воздуха и из органических соединений. Такие микробы определены как миксотрофы (миксо — смесь, т. е. смешанный тип питания). Отдельные виды аутотрофных микробов осуществляют питание подобно зеленым растениям за счет фотосинтеза. Так, пурпурные серобактерии вырабатывают особый пигмент типа хлорофилла — бактериопурпурин, при помощи которого и происходит использование световой энергии (фотосинтез) для построения органических веществ своего тела из угольной кислоты и неорганических солей.

Гетеротрофы (от *греч.* *heteros* — другой) в противоположность аутотрофным микробам используют углерод главным образом из любых готовых органических соединений. К ним относятся возбудители различного рода брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные микроорганизмы — возбудители туберкулеза, бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза,

патогенные стафилококки, стрептококки, диплококки и ряд других инфекций.

Однако все физиологическое многообразие микроорганизмов не укладывается в дифференциацию на аутоотрофы и гетеротрофы. В действительности же при изменении условий среды (например, питания) обмен веществ у микробов может меняться. Так, если микроб поместить в другую, необычную для него питательную среду, он начнет вырабатывать адаптивные (приспособительные) ферменты (энзимы). В качестве примера могут служить азотфиксирующие бактерии (аутоотрофы), которые на богатых белковых питательных средах перестают использовать молекулярный азот воздуха и начинают усваивать связанный азот (гетеротрофный тип усвоения азота).

Гетеротрофы включают в себя две подгруппы: метатрофные и паратрофные микроорганизмы. *Метатрофы*, или сапрофиты, живут за счет использования мертвых субстратов. Сапрофиты (от *греч.* *sapros* — гнилой, *phyton* — растение) — гнилостные микробы. *Паратрофы* (от *греч.* *parasites* — нахлебник) — паразиты, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

В качестве источника углерода гетеротрофы чаще всего используют углеводы, различные органические кислоты. Наиболее полноценными являются сахара (особенно гексозы), многоатомные спирты (глицерин, маннит, сорбит и др.), а также карбоновые кислоты (например, глюкуроновая) и оксикислоты (молочная, яблочная и др.), которые обычно и включают в состав искусственных питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Основным источником азотного питания у аутоотрофов служат неорганические соединения азота, т. е. соли азота, а у гетеротрофов — аминокислоты, которые они используют из белков животного организма, если в нем паразитируют, или получают их готовыми из питательных сред.

По способу усвоения азотистых веществ микробы подразделяют на четыре группы.

1. Протеолитические, способные расщеплять нативные белки, пептиды и аминокислоты.
2. Дезаминирующие, способные отщеплять аминокислоты только у свободных аминокислот.

3. Нитритно-нитратные, усваивающие окисленные формы азота.

4. Азотфиксирующие, обладающие свойством питаться атмосферным азотом.

В качестве универсального источника азота и углерода в питательных средах для патогенных микробов применяют пептоны. Потребность микроорганизмов в зольных элементах незначительна. Необходимые для их жизни минеральные соли (сера, фосфор и др.) присутствуют в естественной питательной среде. Серу бактерии получают в основном из сульфатов или органических соединений аминокислот (цистин, цистеин). Сербактерии, например, могут сами ассимилировать даже молекулярную серу. В их теле находится до 80% серы. Фосфор входит в состав нуклеопротеидов и фосфолипидов бактериальной клетки и играет весьма важную роль в ее биосинтетических процессах. Источник питания фосфором — различные фосфорнокислые соли, например тринатрийфосфат (Na_3PO_4).

Жизненно необходимые элементы — калий, магний и железо — микроорганизмы получают из различных солей. Железо входит в состав гема (особая органическая группа цитоплазмы) и служит катализатором окислительных реакций. Калий — обязательный элемент в питательной среде, но физиологическое значение его еще полностью не выяснено. Роль кальция в жизни бактерий (за исключением бактерий, участвующих в фиксации азота из воздуха), по-видимому, невелика. Магний активизирует различные ферменты бактерий, в частности протеазу. Микроэлементы — бор, цинк, марганец, кобальт и другие — встречаются в бактериях в ничтожных количествах и служат стимуляторами роста микробов.

Факторы роста микробов. В 1901 г. Вильдье в дрожжах обнаружил особое вещество, названное им «биос» — ростовое вещество. В 1904 г. наш соотечественник Я. Я. Никитинский нашел такие же стимуляторы роста в культурах плесневых грибов. В дальнейшем подобные вещества были выявлены у патогенных микроорганизмов и простейших. Одновременно было установлено, что у ряда микробов под воздействием ничтожно малых количеств ростовых веществ существенно увеличивается накопление микробной массы и изменяется обмен веществ. Новейшие данные показали, что по химической

структуре и физиологическому действию стимуляторы представляют собой подлинные витамины или витаминоподобные вещества.

Все изученные бактерии нуждаются в витаминах или ростовых веществах, которые играют главным образом роль катализаторов (ускорителей) биохимических процессов бактериальной клетки. Они же служат структурными единицами при образовании некоторых ферментов. К витаминам, необходимым для развития микробов, принадлежат биотин (витамин Н), витамины группы В: В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₃ (пантотеновая кислота), В₄ (холин), В₅ (никотинамид), В₆ (пиродоксин), В₇ (гемин), витамин К и др. Концентрация витаминов в питательной среде выражается в микрограммах (мкг), потребность в них составляет 0,05–40 мкг/мл. Избыток витаминов задерживает рост бактерий.

Кроме витаминов к факторам роста бактерий относятся пуриновые и пиримидиновые основания и их производные (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил, ксантин и гипоксантин). Например, для гемолитического стрептококка фактор роста это — аденин, для золотистого стафилококка — урацил, возбудителя столбняка — аденин или гипоксантин.

Некоторые микроорганизмы в качестве фактора роста используют аминокислоты, синтезируемые самой микробной клеткой или специально внесенные в питательную среду.

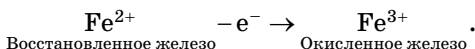
Чтобы охарактеризовать все многообразие способов питания микроорганизмов, были предложены способы, указывающие на источник энергии донора водорода (электронов) и источник углерода.

Организмы, способные использовать в качестве источника энергии свет, называют *фототрофными*. Те, что получают энергию в результате окислительно-восстановительных реакций с участием субстратов, служащих для них источниками питания, — *хемотрофными*. Все организмы, использующие в качестве доноров водорода органические соединения, называют *органотрофными*, а способные использовать неорганические доноры электронов — *литотрофными*.

Цианобактерии и пурпурные серобактерии относят к фотолитотрофам, нитрифицирующие бактерии — к хемолитотрофам и основную массу микроорганизмов — к хемоорганотрофам.

Дыхание микробов — это биологический процесс, сопровождаемый окислением или восстановлением различных, преимущественно органических, соединений с последующим выделением энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), необходимой микробам для физиологических процессов жизнедеятельности.

Процесс, в котором атомы или молекулы отдают электроны (e), называют *окислением*, а обратный процесс — присоединение электронов — *восстановлением*. Примером этого служит обратимая реакция превращения восстановленного двухвалентного железа в окисленное трехвалентное железо.



Перенос электрона всегда сопровождается высвобождением энергии, которая немедленно аккумулируется в аденозиндифосфате (АДФ) и аденозинтрифосфате (АТФ) и расходуется в результате жизнедеятельности микробной клетки.

Установлено, что биологическое окисление протекает путем дегидрирования (отщепления водорода) от окисляемого соединения и последующего присоединения его к активному кислороду или же к другому акцептору, если окисление идет в анаэробных (бескислородных) условиях.

Совокупность окислительно-восстановительных ферментных реакций, осуществляющих последовательный перенос водорода с окисляемого продукта на кислород, называют тканевым дыханием, которое представляет собой дыхательную цепь.

Водород отщепляется от окисляемого органического соединения в виде двух протонов (2H^+) и двух электронов ($2e$), т. е. в виде двух атомов водорода (H_2). В переносе электронов и протонов в реакциях биологического окисления или тканевого дыхания участвуют три главных окислительно-восстановленных фермента.

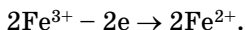
1. Пиридинзависимые дегидрогеназы с коферментами: НАД — никотинамидадениндинуклеотид; НАДФ — никотинамидаденин-динуклеотидфосфат окисленные; НАД- H_2 , НАДФ- H_2 — восстановленные.

2. Флавинзависимые дегидрогеназы с коферментами ФАД; флавинаденин-динуклеотид или ФАМ — флавинаденин-моноклеотид окисленные; ФАД- H_2 или ФАМ- H_2 — восстановленные.

3. Геминные ферменты: цитохромы В, С₁, С; цитохромоксидазы А и А₃, каталаза и пероксидаза. Коферментом их служит гем.

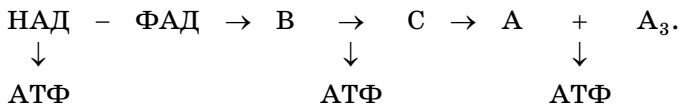
Цитохромы переносят только электроны (е) за счет железа гема. Обычно оно находится в окисленной форме (Fe³⁺), а после присоединения электрона переходит в восстановленную форму (Fe²⁺).

Среди компонентов переноса электронов обнаружен убинон (коэнзим Q). Восстановленный КоQ-H₂ отдает ионы водорода 2H⁺ в окружающую среду (в раствор клетки), а электрон переходит на цитохром и присоединяется к иону железа:



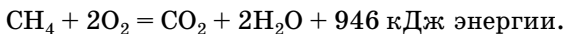
Далее электроны от цитохрома В переходят на цитохром С₁, затем на цитохром С и на цитохромоксидазу А + А₃. С цитохромоксидаз электрон переносится на кислород и превращает его в активную форму. Активный кислород восстанавливается активным водородом до H₂O в 90% случаев или до пероксида водорода в 10% случаев. Пероксид водорода — сильнейший яд, который можно разрушить ферментами каталазой или пероксидазой.

При восстановлении одного атома кислорода активным водородом до H₂O образуется три молекулы АТФ — аденозинтрифосфорной кислоты:



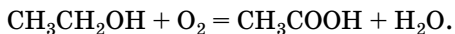
Биологическое окисление субстрата микроорганизмами происходит по типу прямого окисления или дегидрогенирования.

Прямое окисление осуществляется с помощью оксидаз путем непосредственного окисления вещества кислородом воздуха. Оно присуще большинству сапрофитных микроорганизмов. Например, *Bact. metanicum*, окисляя метан, получает энергию по следующей схеме:

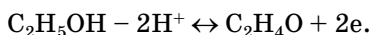


У некоторых микробов, поглощающих кислород, реакции окисления неполные, т. е. не доходят до получения конечного продукта — углекислоты. Примером такого неполного окисли-

тельного процесса служит дыхание уксуснокислых бактерий, у которых конечным продуктом окисления этилового спирта является не углекислота, а уксусная кислота.



Непрямое окисление представляет собой реакцию дегидрогенизации и сопровождается одновременным переносом двух электронов, причем от субстрата отщепляются два протона (H^+). При ферментативном отщеплении водорода от субстрата при помощи дегидрогеназ освобождаются два электрона (энергия) подобно образованию ацетальдегида из этилового спирта:



Дегидрогеназ у бактерий несколько, они называются по донору водорода (например, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа), но большинство их переносит водород на один из двух коферментов — никотинамидадениндинуклеотид (НАД^+) или никотинамидаденин-динуклеотидфосфат (НАДФ^+). Оба кофермента легко отделяются от одной дегидрогеназы и связываются с другой дегидрогеназой, переносят водород на другой акцептор. $\text{НАД} \cdot \text{H} (+\text{H})$ переносит водород преимущественно на предшественников брожения или в дыхательную цепь; $\text{НАДФ} \cdot \text{H} (\text{H})$ — участвует в основном в биосинтезе.

Аэробное дегидрирование происходит в присутствии кислорода и у таких микробов, как, например, бациллы, акцептором водорода является кислород, в результате чего в зависимости от набора ферментов образуется вода или пероксид водорода. Для их целей у аэробных бактерий служат цитохромоксидаза и система геминных ферментов-цитохромов. Цитохромоксидаза катализирует конечное связывание водорода с атмосферным кислородом вне клетки. Если цитохромоксидаза переносит две пары водородных ионов, образуется вода: $4\text{Fe}^{2+} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$. Если она связывает с кислородом воздуха только одну пару водородных ионов, то конечный продукт — пероксид водорода: $2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$. Поскольку пероксид водорода токсичен для бактерий, он моментально разлагается каталазой или пероксидазой. Obligатные анаэробы каталазу не содержат, чем частично можно объяснить токсичность кислорода для них.

Анаэробное дегидрогенирование осуществляется в отсутствие молекулярного кислорода. Акцепторами водорода служат другие неорганические элементы, например соли азотной, серной кислот, углекислоты, которые превращаются при этом в более восстановленные соединения (аммиак, метан, сероводород). Свойство анаэробов переносить электроны на нитраты, сульфаты и карбонаты обеспечивает в достаточной степени полное окисление органического или неорганического вещества без использования молекулярного кислорода и обуславливает возможность получения ими большего количества энергии, чем при процессе брожения. При анаэробном дыхании выход энергии только на 10% ниже, чем при аэробном. Микроорганизмы, для которых характерно анаэробное дыхание, имеют набор ферментов цепи переноса электронов, но цитохромоксидаза у них заменяется нитратредуктазой (в случае использования нитратов) или аденилсульфатредуктазой (в случае использования сульфатов).

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

При изготовлении питательных сред учитывают не только рН среды но и соотношение веществ, отдающих и принимающих электроны. Величину окислительно-восстановительного потенциала обозначают символом gH_2 — отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Он измеряется потенциометром или на универсальном ионметре в mV и обозначается в единицах. Диапазон gH_2 от 0 до 42,6 характеризует все степени насыщения раствора H и O_2 . Так, строгие анаэробы растут при низком окислительно-восстановительном потенциале от 0 до 12, факультативные микроорганизмы — от 0 до 20 и аэробы — от 14 до 35. Следовательно, он минимален при насыщении кислородом. Регулируя степень окислительно-восстановительного потенциала, мы создаем благоприятные условия для роста и размножения микроорганизмов.

Методы создания анаэробии. Для выделения анаэробных возбудителей инфекционных болезней создают анаэробные условия культивирования, используя несколько методов.

Физический метод заключается в удалении воздуха из эксикатора или анаэростана при помощи масляного вакуумного насоса. Жидкие среды перед посевом для удаления из них воздуха кипятят, т. е. проводят регенерирование среды. Для предотвращения контакта жидкой среды с воздухом на ее поверхность наносят слой вазелинового масла.

Химический метод основан на применении поглотителей кислорода, например пирогаллола с гидроокисью натрия, калия либо гидросульфита натрия с гидрокарбонатом натрия в соотношении 1:1.

Биологический метод (метод Фортнера) основан на выращивании анаэробов в присутствии аэробов (например «чудесной палочки») в одной чашке Петри. Вначале вырастает аэробная культура, а затем, по мере поглощения кислорода из чашки, начинает развиваться анаэробная культура.

Комбинированный метод предусматривает использование двух методов, скажем, физического и химического.

Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для бактерий действие кислорода, внося в питательную среду восстановитель (аскорбиновую кислоту, тиогликолат, цистеин).

Рост и размножение бактерий. Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК). Достигнув физиологической зрелости, клетка прекращает рост и начинает размножаться. Под размножением микробов подразумевают их способность к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. То есть размножение — это увеличение числа особей микробной популяции.

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение) в различных плоскостях. Например, у стафилококков новые клетки располагаются беспорядочно, в виде кисти винограда; у стрептококков — в виде цепочки; у диплококков — это соединения по парам; у сарцин — в виде пакетов и др. Процесс деления состоит из ряда последовательных этапов. Первый этап начинается формированием в средней части клетки поперечной перегородки, состоящей вначале из цитоплазматической мембраны, которая

делит цитоплазму материнской клетки на две дочерние. Параллельно с этим синтезируется клеточная стенка, образующая полноценную перегородку между двумя дочерними. В процессе деления бактерий важным условием является репликация (удвоение) ДНК, которая осуществляется ферментами ДНК-полимеразами. Перед удвоением ДНК происходит разрыв водородных связей и образование двух спиралей ДНК, каждая из которых находится в дочерних клетках. Далее дочерние односпиральные ДНК восстанавливают водородные связи и вновь образуют двуспиральные.

Репликация ДНК и деление клеток происходит с определенной скоростью, присущей каждому виду микроба, что зависит от возраста культуры и характера питательной среды. Например, скорость роста кишечной палочки составляет примерно 16–20 мин; у микобактерий туберкулеза — 18–20 ч. Клетки культуры тканей млекопитающих начинают делиться через сутки. Следовательно, большинство видов бактерий размножаются почти в 100 раз быстрее, чем клетки культуры тканей.

Существуют следующие типы деления клеток бактерий.

1. Клеточное деление опережает разделение, что приводит к образованию «многоклеточных» палочек и кокков.

2. Синхронное клеточное деление, при котором разделение и деление нуклеоида сопровождаются образованием одноклеточных организмов.

3. Деление нуклеоида опережает клеточное деление, обуславливая образование многонуклеоидных бактерий.

Разделение бактерий, в свою очередь, происходит тремя способами.

1. Разламывающее разделение, при котором две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают цитоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга, при этом формируются цепочки (сибиреязвенные бациллы).

2. Скользящее разделение, при котором после деления клетки обособляются и одна из них скользит по поверхности другой (отдельные разновидности эшерихий).

3. Секущее разделение, когда одна из разделившихся клеток свободным концом описывает дугу круга, центром которого служит точка ее контакта с другой клеткой, образуя рим-

скую пятерку или клинопись (коринобактерии дифтерии, листерии).

Фазы развития бактериальной популяции. Теоретически допустимо, что если бактериям создать условия непрерывного притока и прогрессивного увеличения массы свежей питательной среды и оттока продуктов выделения, то размножение будет возрастать логарифмически, а гибель — арифметически.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции представляют графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени. Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз, идущих в определенной последовательности.

1. Исходная (стационарная, латентная или фаза покоя) представляет собой период от момента посева бактерий на питательную среду до их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшиться. Продолжительность — 1–2 ч.

2. Во время фазы задержки размножения бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются, продолжительность около 2 ч и зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспосабливаются быстрее, чем старые), биологических особенностей микробных клеток (для кишечных бактерий характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза — длительный), полноценности питательной среды, температуры выращивания, концентрации CO_2 , pH, степени аэрации среды, окислительно-восстановительного потенциала и др. Нередко обе фазы объединяют термином «лаг-фаза» (от *англ.* lag — отставание, запаздывание).

3. В период логарифмической фазы скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (от *лат.* generatio — рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, постоянное для данного вида, а количество бактерий удваивается в геометрической прогрессии. Это означает, что в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй — обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из полученных четырех формируются восемь и т. д.

Следовательно, после n генераций количество клеток в культуре будет равно 2^n . Продолжительность — 5–6 ч.

4. Во время фазы отрицательного ускорения скорость размножения бактерий снижается, число делящихся особей уменьшается, а число погибших увеличивается. Продолжительность около 2 ч. Одна из возможных причин, замедляющих размножение бактерий, — истощение питательной среды, т. е. исчезновение специфических веществ, необходимых для жизнеспособности данного вида.

5. В период стационарной фазы максимума число новых бактерий почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжительность — 2 ч.

6. Фаза ускорения гибели характеризуется прогрессивным превосходством числа погибших клеток над числом вновь нарождающихся. Продолжительность — около 3 ч.

7. Во время фазы логарифмической гибели отмирание клеток происходит с постоянной скоростью. Продолжительность — около 5 ч.

8. В период фазы уменьшения скорости отмирания остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

У микроскопических грибов различают три типа размножения: вегетативное, бесполое и половое. При вегетативном размножении происходит отделение от мицелия его частей, которые, развиваясь, образуют новую грибницу. Кроме того, мицелий может фрагментироваться на артроспоры (оидии) и хламидоспоры. *Артроспоры* — короткие овальные клетки, образующиеся при распаде гиф, каждая из которых дает начало новой клетке. *Хламидоспоры* — споры вегетативного размножения грибов, покрытые толстой темноокрашенной оболочкой; образуются при распаде гиф на отдельные клетки. Этот тип размножения также может осуществляться путем почкования мицелия или отдельных клеток, например у дрожжевых грибов. Наиболее распространено бесполое размножение при помощи спор.

Созревшие конидии у грибов осыпаются. При созревании спорангиоспор спорангии лопаются и из них высыпаются споры. Попав в благоприятные условия, они прорастают в гифы.

При половом размножении грибов спорообразованию предшествует слияние гаплоидных мужских и женских гамет, в

результате чего возникает зигота и наступает диплоидная фаза с полным (парным) набором хромосом. Половой процесс у разных групп грибов протекает различно и имеет свои особенности.

Наиболее распространенный способ вегетативного размножения дрожжей (гетеротрофы с окислительным или бродильным типом метаболизма) — почкование, реже — деление. При половом размножении после копуляции двух клеток и при слиянии ядер зигота превращается в аску, диплоидное ядро делится 2–3 раза и образуется четыре или восемь аскоспор, каждая из которых может прорасти в новую клетку.

Синтез микробных пигментов, фосфоресцирующих и ароматообразующих веществ. Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности синтезируют красящие вещества — пигменты, придающие колониям бактериальных культур разнообразный цвет и оттенки, что учитывают при дифференциации микроорганизмов. Различают красные пигменты (актиномицеты, дрожжи, грибы, «чудесная палочка» — *Bact. marcencens*), желтые или оранжевые (микобактерии туберкулеза, сарцины, стафилококки), сине-зеленого цвета (синегнойная палочка — *Pseudomonas aeruginosa*, бактерия синего молока — *Bact. syncyanum*), фиолетовые (*Chromobacterium veolaceum*), черные (некоторые виды грибов, дрожжей, актиномицетов). Образование пигментов происходит в присутствии кислорода при комнатной температуре и освещении. Такие микроорганизмы, развиваясь на пищевых продуктах (молоко, сыр, мясо, рыба, масло, творог), изменяют их цвет.

Различают пигменты, растворимые в воде (синегнойная бактерия, бактерии сине-зеленого молока — пиоцианин, синцианин), в спирте (пигменты «чудесной» бактерии, стафилококков и сарцин — красный, золотистый, лимонно-желтый), нерастворимые ни в воде, ни в спирте (черные пигменты актиномицетов, грибов, азотобактера), выделяющиеся в окружающую среду (хромонарные), остающиеся в теле микроорганизмов (хромофорные).

Физиологическое значение пигментов в жизнедеятельности микроорганизмов до конца не изучено. Точно установлено, что пигментообразующие микроорганизмы более резистентны к действию физико-химических и биологических факторов.

1.4. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

К числу основных физических факторов, воздействующих на микроорганизмы как в естественной среде обитания, так и в искусственно созданных условиях, относятся: температура, свет, электричество, высушивание, различные виды излучения, осмотическое давление и др.

О влиянии **температуры** на микроорганизмы обычно судят по их способности расти и размножаться в определенных температурных границах. Для каждого вида бактерий определена такая оптимальная граница. В зависимости от пределов этой температуры бактерии разделены на следующие три физиологические группы: психрофильные (от *греч.* *psychros* — холодный, *phileon* — любить), мезофильные (*mesos* — средний) и термофильные (*termos* — теплый).

Психрофильные микроорганизмы (психрофилы) — преимущественно обитатели северных морей, почвы, сточных вод (свetryащиеся бактерии, некоторые железобактерии и др.). Температурные границы психрофилов: минимум — около 0°C, оптимум — 15–20, максимум — 30–35°C.

Мезофильные бактерии — наиболее обширная группа. Сюда относятся большинство сапрофитов и все патогенные микроорганизмы. Температурный минимум — 10°C, оптимум — 30–37, максимум — 40–45°C.

Термофильные бактерии часто и в большом количестве встречаются в природе — почве, воде, теплых минеральных источниках, а также в пищеварительном тракте животных и человека. Их температурный минимум — 35°C, оптимум — 50–60, максимум — 70–75°C.

Способность некоторых неспорообразующих бактерий существовать в горячих источниках при температуре 40–93°C и выше послужила основанием для выделения этих организмов в новую группу *экстремально-термофильных бактерий*. Возможность существования термофилов при высокой температуре обусловлена особым составом липидных компонентов клеточных мембран, высокой термостабильностью белков и ферментов, а также клеточных ультраструктур.

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микробы. При низких температурах микробная клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать длительное время. Так, эшерихии сохраняют жизнеспособность при -190°C до 4 мес., холерный вибрион при -45°C до 2 мес., возбудитель листериоза при -10°C до 3 лет. Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы. На этом принципе основано хранение продуктов в ледниках, погребах и холодильниках. В микробиологической практике широко применяется длительное хранение культур микробов, иммуноглобулинов, антибиотиков, живых вакцин в высушенном виде из замороженного состояния (-76°C). Данный метод называется *лиофилизацией* (от греч. *lyo* — растворять, *phileo* — люблю).

При лиофилизации свободная вода и вода, непрочно связанная с гидрофильными веществами клеток, подвергается замораживанию, и затем происходит сублимация льда, т. е. его переход из твердого состояния в парообразное, минуя жидкую фазу. После этого остается сухая пористая масса, которая при добавлении к ней воды легко суспендируется. Повторное замораживание и оттаивание неблагоприятно воздействуют на микроорганизмы и может стать причиной их гибели при лиофилизации.

Высокая температура, в особенности нагревание паром под давлением, губительно действует на микробы. Чем выше температура предела максимума, тем быстрее погибают вегетативные формы микроорганизмов, так, при 60°C — через 30 мин, при 70°C — через 10–15, при 80 – 100°C — через 1 мин. В основе бактерицидного действия высоких температур лежит разрушение ферментов каталазы, оксидаз, дегидраз за счет денатурации (свертывание) белков и нарушения осмотического барьера. Воздействие высокой температурой — самый распространенный, удобный и надежный способ стерилизации, т. е. обеспложивания (*sterilis* — бесплодный), уничтожения различных микробов и их спор в разнообразных объектах. Существуют разные способы стерилизации: прокалывание на огне, кипячение, стерилизация сухим жаром в печах Пастера (сухожаровые шкафы), стерилизация паром под давлением в автоклавах, без давления в аппарате Коха, тиндализация (дробная стерилизация

при 56–58°C), пастеризация — метод, предложенный Пастером с целью сохранения питательной ценности молока, вина, различных консервов, которые постепенно нагревают до 80°C за 30 мин, а затем быстро охлаждают до 4–8°C. При пастеризации погибают вегетативные формы микробов, споры же сохраняются, но быстрое охлаждение и хранение продукта при 4–5°C препятствует их прорастанию и последующему размножению микробов.

Стерилизации подвергают перевязочный материал, хирургические инструменты, различные растворы. Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранении, хирургических вмешательствах, называется *асептикой*. Уничтожение микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (растворы хлора, йода, пероксид водорода, калия перманганата, этакридина лактата, метиленового синего, бриллиантового зеленого, азотнокислого серебра и др.) называется *антисептикой* (от *греч.* *anti* — против, *septikos* — гнилостный).

Многие виды микроорганизмов надолго сохраняют жизнеспособность после **высушивания**, хотя расти и размножаться в этих условиях не могут. В высушенной мокроте больных туберкулезом возбудитель остается вирулентным до 10 мес., споры бацилл сибирской язвы сохраняются свыше 60 лет, плесневых грибов — до 20. Высушивание сопровождается обезвоживанием цитоплазмы и денатурацией белков и бактерий.

Дегидратация (обезвоживание) вегетативных форм бактериальных клеток преимущественно вызывает их гибель. Некоторые микроорганизмы, особенно морские и пресноводные, а также патогенные виды быстро погибают при высыхании, т. е. они не могут существовать без воды или соков животного организма. Споры, конидии, артроспоры или хламидоспоры — все это покоящиеся клетки, специально адаптированные к длительному пребыванию без воды.

В природе микроорганизмы часто оказываются в условиях недостаточной влажности — в сухой почве, на высушенных растениях, а в зимний период микробные клетки теряют часть воды в результате замораживания. Высушивание используют для консервирования кормов (сена, соломы), овощей, фруктов, лекарственных трав.

Гидростатическое давление как фактор окружающей среды также влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. Чувствительность бактерий к нему неодинакова. Бактерии, устойчивые к высокому давлению, называют *барофильными* (от греч. *baros* — тяжесть). Они существуют при давлении в 10^5 Па (выделены из образцов, взятых со дна океанов, с глубины 5 тыс. м); споры бацилл сохраняются при давлении $2 \cdot 10^6$ Па. Режим повышенного давления (10^3 – 10^6 Па) в сочетании с высокой температурой (120°C) используют в автоклавах в целях обезвреживания (стерилизации) материалов, содержащих возбудителей инфекционных болезней.

Большое влияние на рост микроорганизмов оказывает осмотическое давление среды, определяемое концентрацией растворенных в ней веществ. Оно выполняет важную функцию в метаболизме микробной клетки. Внутри бактерий осмотическое давление соответствует давлению 10–20% -ного раствора сахарозы. В среде с более высоким осмотическим давлением наступает *плазмолиз* (потеря воды и гибель клетки), а в среде с низким осмотическим давлением — *плазмолизис* (вода поступает внутрь клетки, и клеточная стенка может разорваться). Явления плазмолиза и плазмолизиса используют в промышленности и в быту при консервировании продуктов (огурцы, помидоры, капуста и др.).

Осмотическое давление клетки у грамположительных бактерий составляет $3 \cdot 10^6$ Па, у грамотрицательных — $4 \cdot 10^5$ – $8 \cdot 10^5$ Па. Следовательно, в растворах с высоким осмотическим давлением (около $9 \cdot 10^6$ – 10^7 Па — 15–20% -ный раствор NaCl) созданы условия, препятствующие росту бактерий и ряда других организмов. Микроорганизмы, которые могут активно размножаться при высоком осмотическом давлении, называются *осмофильными* или *галофилы* (любящие соль). Их ферменты активны только при повышенном содержании хлорида натрия, ионы натрия необходимы галофилам для усвоения из окружающей среды питательных веществ. Некоторые галофилы размножаются при высокой 20–30% -ной концентрации хлорида натрия (роды *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*), например, в солончаковых почвах, рассолах для соления рыбы, мяса (обычно вызывают порчу этих продуктов).

В настоящее время в микробиологии возникло новое направление — *баробиология*, изучающее роль гидростатического

давления как экологического фактора, оказывающего влияние на распространение и активность микроорганизмов в глубине морей и океанов.

Различные виды излучения. Степень бактерицидного действия излучения на микробы зависит от вида лучевого излучения, дозы и длительности экспозиции.

Действие видимого излучения (света). Видимый, рассеянный свет (длина волн 300–1000 нм) угнетает жизнедеятельность микроорганизмов, но в более слабой степени, чем прямые солнечные лучи. В связи с этим культивирование микроорганизмов на искусственных питательных средах осуществляют в темноте, в термостатах, где поддерживается оптимальная для размножения микробов температура. Видимый свет положительно влияет только на пигментообразующие бактерии, которые используют световую энергию для фотосинтеза и при этом активно образуют пигмент — микробная культура окрашивается в красный, зеленый и другие цвета.

Микроорганизмы, не образующие пигменты, можно сделать чувствительными к искусственному свету, если окрасить их метиленовой синью, эозином и др. Это явление названо *фотосенсибилизацией*, а действие — *фотодинамическим*.

Прямые солнечные лучи убивают все микроорганизмы, кроме пурпурных и зеленых серобактерий, развитию последних солнечный свет благоприятствует. Свет напрямую не разрушает бактериальную клетку, как химические вещества. *Бактерицидное действие света* связано с образованием гидроксильных радикалов и других высокореактивных веществ, действующих губительно на микробную клетку. В ряде исследований при облучении микробов отмечена инактивация ферментов.

Микробы-сапрофиты более устойчивы к воздействию света, чем патогенные. Это объясняется тем, что они, чаще подвергаясь действию прямых солнечных лучей, становятся более адаптированными к ним. Патогенные же микроорганизмы весьма чувствительны к действию света. Так, под действием прямых солнечных лучей культуры пастерелл гибнут через 7–12 мин, а возбудители туберкулеза — через 45–50 мин.

Гигиеническое значение воздействия солнечного света огромно, оно представляет собой один из факторов самоочищения воздуха, рек и верхних слоев почвы.

Ультрафиолетовое излучение (УФИ) с длиной волн 400–300 нм является химически активным, 330–295 нм — биологически активным, а 295–200 нм — бактерицидно активным. Механизм действия УФИ заключается в том, что в цепях ДНК между остатками тимина образуются ковалентные связи, что приводит к частичному или полному подавлению репликации ДНК, а также повреждению рибонуклеиновых кислот (особенно мРНК).

При облучении микроорганизмов УФИ с длиной волны 320–400 нм возможна *фотореактивация*, т. е. восстановление жизнеспособности микроорганизмов.

УФИ широко применяют для санации воздуха в животноводческих помещениях, в лабораториях и промышленных цехах (бродильная промышленность, производство антибиотиков), в боксах для создания асептических условий. Для дезинфекции воздуха предназначены лампы низкого давления, типа БУВ-15, БУВ-30, БУВ-30П, БУВ-60П и ДБ-60. На основе использования ультрафиолетовых и инфракрасных ламп для животноводческой практики применяют установку ИКУФ-1. Промышленностью выпускаются также бактерицидные облучатели с одной или двумя лампами БУВ-30 или БУВ-60П, последние широко применяются в животноводстве и птицеводстве для дезинфекции воздуха помещений.

Ионизирующее излучение. Рентгеновское излучение — электромагнитное излучение с длиной волны 0,006–10 нм, гамма-излучение (γ) — коротковолновое излучение, бета-излучение (β) или катодное излучение (высокоскоростные электроны), альфа-излучение (α) или высокоскоростные ядра гелия и нейтроны оказывают слабое инактивирующее действие на микроорганизмы. Бактерицидность наиболее сильнодействующего γ -излучения слабее, чем УФИ, — гибель бактерий наступает только при облучении высокими дозами от 44 до 280 тыс. рентген. Бактерии обнаружены в воде атомных реакторов, где величина радиоактивного облучения достигает 2–3 млн рентген. Микроорганизмы, находящиеся на расстоянии 3–5 см от источника облучения (кобальтовая пушка — свинцовый шар, внутри которого помещен Co_{60}), погибают через 5–6 ч, на расстоянии 10 см — через 48 ч.

Механизм действия рентгеновского излучения заключается в поражении ядерных структур, в частности нуклеиновых

кислот цитоплазмы, т. е. поражается генетический аппарат микробной клетки, что приводит к ее гибели или мутации. Неблагоприятное воздействие ионизирующих излучений усиливается в присутствии кислорода.

Ионизирующую радиацию как метод холодной стерилизации применяют для уничтожения микробов на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах (при этом не снижается их качество, так как не происходит денатурации составных ингредиентов, как при тепловой стерилизации).

Лазерное излучение используют в основном для уничтожения пигментообразующих бактерий (синегнойная палочка и др.). Под его влиянием все биологические объекты претерпевают необратимые изменения (денатурация белка и др.), поскольку при энергии излучения в 1 Дж и размере светового пучка 1,5 мм в точке фокуса излучения на глубине 100 мкм создается температура 60°C. Бактерии погибают при следующем режиме: длина волны — 694,3 нм, энергия — 200 Дж и длительность облучения — 10^{-3} с.

Электричество. Ток малой и высокой частоты убивает микроорганизмы. Особенно сильное бактерицидное действие оказывают токи ультравысокой частоты. Они приводят в колебание молекулы всех элементов клетки, вследствие чего происходит быстрое и равномерное нагревание всей массы независимо от температуры окружающей среды. Установлено, что длительное воздействие токов высокой частоты приводит к электрофорезу некоторых компонентов среды. Соединения, образующиеся при этом, инактивируют микробную клетку.

Ультразвук (волны с частотой около 20 тыс. Гц) используют для стерилизации пищевых продуктов и дезинфекции предметов. Механизм его бактерицидного действия заключается в том, что в цитоплазме микроорганизмов, находящихся в жидкой среде (вода, молоко), образуется кавитационная полость, которая заполняется парами жидкости, в пузырьке возникает давление в 10^6 Па, что приводит к дезинтеграции цитоплазматических структур. Возможно, что в образующихся кавитационных полостях озвученной среды возникают высокореактивные гидроксильные радикалы, которые парализуют жизнедеятельность микроба.

Аэроионизация. Аэроионы, несущие положительный или отрицательный заряд, возникают в результате искусственной

или естественной ионизации воздуха. Более сильное влияние на бактерии оказывают отрицательно заряженные ионы, действуя уже в средних концентрациях ($5 \cdot 10^4$ в 1 см^3 воздуха). Положительные аэроионы задерживают рост бактерий лишь в больших концентрациях (10^6). Сила действия ионов зависит от дозы — числа аэроионов на 1 см^3 воздуха, длительности экспозиции, расстояния от источника ионов. Аэроионизацию используют для обезвреживания цехов предприятий, жилых помещений, а также в медицинской и ветеринарной практике.

Химические факторы. Химические вещества могут тормозить или полностью подавлять рост микроорганизмов. Если химическое вещество подавляет рост бактерий, но после устранения его воздействия их рост возобновляется, то это явление называют *бактериостаз* (бактериостатическое действие), т. е. происходит задержка роста микроба, а не его гибель.

При *бактерицидном действии* химический агент вызывает гибель клеток. Бактерицидное действие химических веществ имеет огромное значение, и его учитывают при использовании химического вещества в качестве дезинфектанта. Эффективность дезинфицирующих средств зависит от многих факторов: биологических особенностей микроорганизмов, концентрации раствора, экспозиции, температуры и окружающей среды.

Противомикробные вещества по химическому строению и механизму бактерицидного действия можно подразделить на следующие группы: окислители, галогены, соединения металлов, кислоты и щелочи, поверхностно-активные вещества, спирты, красители, производные фенола и формальдегида.

Окислители. К этой группе принадлежат перекись водорода и перманганат калия. Данные соединения, выделяя активный атомарный кислород, вызывают цепную реакцию свободно-радикального перекисного окисления липидов, что ведет к деструкции мембран и белков микроорганизмов.

Галогены — это хлор, йод и их препараты: хлорная известь, хлорамин Б, 5% -ный спиртовой раствор йода, йодиол, йодоформ. Их бактерицидное действие связано со способностью отщеплять активные галогены — хлор и йод, которые, замещая водородные атомы у атомов азота, денатурируют белки цитоплазмы микроорганизмов, а также, выделяя атомарный кислород, оказывают значительное окисляющее действие.

Соединения тяжелых металлов — это соли свинца, меди, цинка, серебра, ртути, металлоорганические соединения серебра — протаргол, колларгол. Они оказывают противомикробное действие. В зависимости от концентрации и свойств катиона они вызывают местный вяжущий, раздражающий и прожигаящий эффекты на ткани микроорганизма.

Антимикробное действие соединений тяжелых металлов обусловлено ослаблением активности ферментов, содержащих сульфгидрильные группы, а также образованием с белками альбуминатов: $R - COOH + AgNO_3 \rightarrow R - COOAg + HNO_3$. Посеребрённые предметы, песок при контакте с водой придают ей бактерицидные свойства по отношению ко многим видам бактерий.

Механизм бактерицидного действия заключается в адсорбации положительно заряженных ионов металла на отрицательно заряженной поверхности бактерий и изменении проницаемости их цитоплазматической мембраны, в результате чего происходит гибель микробной клетки.

Кислоты и щелочи. В основе бактерицидного действия кислот и щелочей лежат дегидратация микроорганизмов, изменение рН питательной среды, гидролиз коллоидных систем и образование кислотных и щелочных альбуминатов.

Кислоты в концентрированных растворах коагулируют белки микробной клетки, изменяют концентрацию Н-ионов в растворах и оказывают окисляющее действие. На практике их применяют для уничтожения микробов на объектах окружающей среды (серная, соляная, уксусная кислоты), создания определенной величины рН в питательных средах (соляная кислота), при изготовлении и консервировании пищевых продуктов (уксусная, лимонная), так как кислая реакция среды (кислотность) неблагоприятна для развития гнилостных микроорганизмов.

Бактерицидность щелочей зависит от диссоциации и концентрации гидроксильных ОН-ионов. Наиболее часто в ветеринарной практике применяют NaOH (гидроксид натрия) и KOH (гидроксид калия), гашеную известь (гидроксид кальция), натрия карбонат (Na_2CO_3), натрия гидрокарбонат (сода). Бактерицидное действие проявляется при сравнительно невысокой концентрации щелочей, так, гибель вегетативных форм микроорганизмов наступает под влиянием 2–3%-ного, спор бацилл — 4–5%-ного растворов.

Поверхностно-активные вещества. Катионные детергенты (церигель, дегмицид, этоний, декаметоксин и роккал) представляют собой соединения четвертичных аммонийных оснований, содержащих радикалы с длинной цепью углеродных атомов. Анионные детергенты нарушают проницаемость и осмотическое равновесие микробной клетки, что и приводит к ее гибели. К ним относится зеленое мыло.

Спирты. Практический интерес из этой группы соединений представляет спирт этиловый (C_2H_5OH). Антимикробная активность его обусловлена способностью отнимать воду и свертывать белок. Бактерицидное действие оказывает уже 20%-ная концентрация спирта, но наиболее эффективен 70%-ный спирт. Более высокие концентрации спирта (80–90%) в белковой среде образуют плотные белковые сгустки, внутри которых могут сохраняться живые бактерии.

Бактерицидность спиртов зависит от их молекулярной массы по мере ее возрастания: метиловый → этиловый → пропиловый → бутиловый → амиловый и т. д.

Красители. Обладают свойствами подавлять рост бактерий. Они действуют медленно, но более избирательно. К ним относятся бриллиантовый зеленый, этакридина лактат, флавакридина гидрохлорид, метиленовый синий и др. Бриллиантовый зеленый, соединяясь с белком, липидами или мукополисахаридами бактериальной клетки, приводит к ее гибели. Акридин блокирует у бактерий жизненно необходимые для обмена анионные группы катионами акридина. Метиленовый синий, выполняя роль акцептора и донора ионов водорода, изменяет течение окислительно-восстановительных реакций и нарушает жизнеспособность микробной клетки. Эти средства особенно эффективны при кокковых инфекциях.

Фенол, крезол и их производные. Эффективность действия препаратов этой группы обусловлена их способностью легко проникать через фосфолипиды клеточных мембран, денатурировать белок цитоплазмы и подавлять функцию кофермента (дифосфо-пириндин нуклеотида), участвующего в дегидрировании глюкозы и молочной кислоты, что сопровождается глубокими нарушениями метаболизма и гибелью патогенных микробов. Белок не препятствует противомикробной активности фенола, что дает ему преимущество перед другими дезинфектантами.

Формальдегид (бесцветный газ). В практике применяют 40%-ный водный раствор формальдегида (формалин). Растворенный в воде формальдегид губительно влияет на вегетативные и споровые формы бактерий, вызывает дегидратацию поверхностных слоев, легко проникает в бактериальную клетку, вступает в связь с аминогруппами белков, денатурирует их.

Химические вещества (хлор и хлорсодержащие вещества, гидроксид натрия, фенолы, формальдегид) широко используют для дезинфекции и химической стерилизации. *Дезинфекция* — уничтожение только патогенных микроорганизмов в окружающей среде, а не всех микробов вообще, находящихся на объекте. Качество дезинфекции оценивают бактериологическим методом. В качестве тест-микробов используют кишечную палочку (*E. coli*) или золотистый стафилококк (*Staph. aureus*) в зависимости от инфекции, при которой проводится дезинфекция.

После дезинфекции берут с помощью ватно-марлевых тампонов пробы смывов с разных поверхностей обработанных объектов, помещают их в раствор нейтрализатора дезсредства, а затем засевают (вносят) на питательные среды. Дезинфекцию считают удовлетворительной при отсутствии роста тест-микробов в питательных средах.

Действие **биологических факторов** проявляется, прежде всего, в антагонизме микробов, когда продукты жизнедеятельности одних микробов вызывают гибель других. Антагонистические свойства наиболее выражены у актиномицетов, споровых бацилл (*Bac. brevis*, *Bac. subtilis*) и др.

Явление антагонизма микроорганизмов было открыто в 1887 г. французским ученым Л. Пастером. Одним из первых, кто на практике применил микробный антагонизм, был И. И. Мечников, который предложил использовать продукты, содержащие молочнокислые бактерии, с целью подавления гнилостной микрофлоры кишечника.

Антибиотики (от *греч.* anti — против, bios — жизнь) — биологически активные вещества, образуемые в процессе жизнедеятельности грибов, бактерий, животных, растений, а также созданные синтетическим путем, способные избирательно подавлять рост и убивать микроорганизмы, грибы, риккетсии, крупные вирусы, простейшие и отдельные виды гельминтов. Они отнесены к разряду «химиотерапевтических средств» и предназначе-

ны для избирательного действия на возбудителей заболеваний, находящихся во внутренних органах и тканях (кровь, лимфа, межтканевая жидкость) больных животных и людей.

Начало учению об антибиотиках было положено в 1929 г., когда английский ученый А. Флеминг доказал, что фильтрат бульонной культуры плесневого гриба *Penicillium notatum* обладает антибактериальными свойствами в отношении стафилококков и некоторых других грамположительных микроорганизмов. Однако извлечь пенициллин из культуральной жидкости плесневого гриба удалось лишь в 1940 г. группе английских химиков (Э. Чейн, Г. Флори и Э. Эбрахем). В России пенициллин был получен З. В. Ермольевой в 1942 г. Открытие пенициллина послужило толчком для широких поисков антибиотических веществ. В настоящее время их насчитывается более 2 тыс., выделенных из различных источников.

В животноводстве антибиотики применяют с лечебной целью, для стимуляции роста и развития животных и птиц.

По происхождению антибиотики можно разделить на пять групп.

1. *Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.* Грибы и лишайники являются продуцентами активных антибиотиков. Так, из культуральной жидкости *Penicillium notatum* выделен пенициллин, *Cephalosporium acremonium* — цефалоспорин, *Aspergillus fumigates* — фумагиллин, *Penicillium urticae* — гризефульвин, *Trichothecium roseum* — трихотецин. Лишайники продуцируют усниновую кислоту, обладающую сильным антибиотическим действием. К натриевой соли усниновой кислоты особенно чувствительны дифтерийные палочки.

2. *Антибиотики, образуемые актиномицетами,* нашли наиболее широкое применение в практике. Из культуральных жидкостей актиномицетов были выделены многие антибиотики: *Streptomyces greuseus* — стрептомицин, *Str. fradiae* — неомицин, *Str. Canamyceticus* — канамицин, *Micromonospora* — гентамицин, *Str. Aureofaciens* — хлортетрациклин, *Str. venezuelae* — хлорамфеникол, *Str. erythreus* — эритромицин, *Str. fradiae* — тилозин, *Str. bevoris* — леворин, *Str. spheroides* — новобиоцин, *Str. mediterranei* — рифамицин, *Str. neursei* — нистатин.

3. *Антибиотики, выделенные из бактерий.* Группа антибиотиков бактериального происхождения менее обширна и имеет

меньшее практическое значение, так как эффективность их значительно ниже, чем у антибиотиков грибного и актиномицетного происхождения. Продуценты антибиотиков — разнообразные бактерии. В большинстве своем это сапрофиты, обитающие в почве и обладающие ярко выраженной антимикробной активностью. К ним относятся грамицидин, колицин, пиоционин, субтилин, полимиксин и др. Некоторые из этих антибиотиков токсичны при парентеральном введении, поэтому их применяют местно.

4. *Антибиотики животного происхождения.* Биологически активные вещества, образуемые животными тканями, обладают не только антибиотическим действием, но и активизируют защитные силы макроорганизма, что позволяет применять их для профилактики и лечения ряда заболеваний. К ним относятся эритрин, выделяемый из эритроцитов различных животных; экмолин, полученный из тканей рыб; лизоцим — полисахарид, полученный из яичного белка. Клетки некоторых тканей продуцируют интерферон, угнетающий жизнедеятельность многих возбудителей вирусных инфекций.

5. *Антибиотики растительного происхождения.* Многие растения выделяют летучие и нелетучие биологически активные вещества — фитонциды, способные обеспечить устойчивость растений к различным болезням. Фитонциды были открыты Б. П. Токиным в 1928 г. Наибольшими антибиотическими свойствами обладают фитонциды лука, чеснока, хрена, горчицы, алоэ, плодов можжевельника, почек березы, листьев черемухи, листьев эвкалипта и некоторых других растений. Они инактивируют ряд жизненно важных ферментов и подавляют жизнедеятельность сарцин, стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей и других микроорганизмов.

Некоторые фитонциды выделены в чистом виде: аллицин — из чеснока (*Allium sativum*), подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий; рафанин — из семян редиса (*Raphanus sativus*), действует на грамположительные и грамотрицательные бактерии в разведении 1:100; иманин — из зверобоя пронзеннолистного (*Hypericum perforatum*), применяют при лечении инфицированных ран и тяжелых ожогов.

Под влиянием некоторых фитопатогенных грибов ткани пшеницы, ржи, кукурузы образуют антибиотические вещества — фитоалексины, обладающие антибиотическим действием

по отношению к фитопатогенным грибам. Так, клетки гороха (*Pasum sativum*) продуцируют пизатин, клетки фасоли (*Phaseolus vulgaris*) — фазеолин.

В настоящее время широко применяются высокоэффективные антибиотики, полученные биосинтетическим путем. Однако некоторые особенности химического строения антибиотиков ограничивают их терапевтический эффект. Поэтому путем направленного синтеза созданы полусинтетические препараты, которые, сохраняя основные преимущества известных антибиотиков, приобрели новые дополнительные свойства: изменение физико-химических констант, устойчивость к действию ферментов, продуцируемых резистентными штаммами микроорганизмов, расширение спектра действия.

Единицы измерения противомикробной активности антибиотиков. Биологическая активность антибиотиков основана на подавлении роста чувствительного тест-микроба (золотистого стафилококка № 209 для пенициллина, *Bac. subtilis*, *E. coli* для стрептомицина). Для этой цели используют метод диффузии в плотные питательные среды (метод бумажных дисков) или в жидких средах (метод серийных разведений). Противомикробная активность измеряется тем наименьшим количеством антибиотика, которое оказывает противомикробное действие, и выражается либо в единицах действия — ЕД, либо в единицах массы. Так, за единицу пенициллина принимают 0,6 мкг чистой кристаллической соли, за единицу стрептомицина — 1 мкг чистого сухого препарата и т. д.

Антибиотики обладают характерными свойствами — четко выраженной избирательностью и специфическим механизмом противомикробного действия. Каждый антибиотик имеет определенный антимикробный спектр действия: одни действуют на немногие виды микроорганизмов (пенициллин, грамицидин), а другие имеют широкий спектр антимикробного действия (левомицетин, тетрациклин, полимиксин, гентамицин и др.).

Антибиотики близкого химического строения обычно имеют сходный антимикробный спектр и механизм действия. По механизму действия на микроорганизмы их разделяют на несколько основных групп.

1. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин).

2. Антибиотики, нарушающие функцию цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин).

3. Антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка (тетрациклины, хлормицетины, амино-гликозиды, макролиды).

4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот:

- ингибиторы синтеза РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин и др.);
- ингибиторы синтеза ДНК (брунеомицин, саркомицин).

Антибиотик лишь воздействует на возбудителя заболевания, окончательная ликвидация инфекционного процесса происходит в результате мобилизации защитных механизмов макроорганизма.

Учитывая, что в основе лечения с применением антибиотиков лежит сложная иммунобиологическая реакция, важно знать их иммунодепрессивные свойства. Прежде чем назначать тот или иной антибиотик, ветеринарный специалист должен знать его свойства, способ введения, спектр и механизм противомикробного действия, срок циркуляции в организме животного и пути выведения из него, а также показания к применению. При несоблюдении этих правил могут возникнуть тяжелые последствия — токсикозы, морфофункциональные изменения в желудочно-кишечном тракте, нейротоксическое, нефротоксическое и гепатотоксическое действия, угнетение функции эндокринной и кровяной систем.

Не следует слишком увлекаться антибиотикотерапией, так как продолжительный прием этих препаратов может вызвать развитие суперинфекций — болезней, связанных с нарушением нормальных взаимоотношений между обитателями живого организма. В таких случаях угнетается не только возбудитель инфекции, но и нормальная микрофлора организма. Одновременно начинает размножаться нечувствительная к антибиотикам микрофлора, вызывая дисбактериоз, кандидозы, сопровождающиеся гастроэнтеритами, колитами и др.

Устойчивость микробов к антибиотикам. Целый ряд микробов под влиянием антибиотиков, особенно при неправильном их применении, утрачивает чувствительность к ним и образует антибиотикорезистентные формы. Устойчивость к антибиотикам

возникает в результате нарушения трансляции генетической информации и изменения синтеза полипептидной цепи, пониженной проницаемости цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, образования ферментов, инактивирующих антибиотики.

У таких микробов снижается физиологическая роль мишеней, активизируется синтез фермента, способного инактивировать антибиотик, и изменяется антигенная структура, что приводит к усилению их вирулентности (например, стафилококки). В таких случаях применение антибиотиков с лечебной целью становится бессмысленным.

С целью предотвращения возникновения антибиотикостойчивых микробов при лечении животных необходимо комбинировать антибиотики или использовать их в сочетании с другими химиотерапевтическими средствами (сульфаниламидами, нитрофураны, производные оксихинолина) и применять препараты, повышающие иммунологическую реактивность организма.

Бактериофаги называют вирусами бактерий. Данное явление изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Творт (1915), Ф. Д'Эрелль (1917). В результате исследований было принято решение называть агента, разрушающего бактерии, — *бактериофагом* (от греч. *phagos* — пожирающий). Бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

Бактериофаги широко распространены в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека. Они обнаружены более чем у 100 видов бактерий (С. Я. Гайдамович, 1982).

Бактериофаги поражают бактерии определенной группы. Хозяевами бактериофагов являются многие микробы, в частности эшерихии и сальмонеллы, стафилококки и стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и другие микроорганизмы. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой обусловлено следующими факторами:

- наличием рецепторов, на которых может фиксироваться фаг;
- наличием в клеточной оболочке и цитоплазме ферментов, способствующих проникновению нуклеиновой кислоты — вещества, из которого строятся гены;

- наличием в клетке ферментов, материалов и энергетических ресурсов, обеспечивающих синтез компонентов фага и формирование частиц фага (вирионов).

В зависимости от этого процесс взаимодействия фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции, или лизогении. Различают вирулентные и умеренные фаги. *Вирулентные фаги* при проникновении в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис. *Умеренные фаги* не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

По степени специфичности фаги разделяют на три группы: *полифаги* лизируют родственные бактерии, *монофаги* — бактерии одного вида, *фаговары* — определенные варианты данного вида бактерий.

Процесс взаимодействия фага с клеткой состоит из последовательной смены отдельных стадий.

Первая стадия — адсорбция фага и прикрепление его при помощи отростков белкового хвоста к клеточной стенке бактериальной клетки на специфических рецепторных участках (белковые и липидные). Фаг узнает их концевыми нитями своих отростков и прочно прикрепляется.

Вторая стадия — проникновение. После адсорбции ДНК фага через дистальный конец отростка продвигается сквозь рыхлые слои клеточной стенки, которые разрушаются под действием фагового лизоцима.

Третья стадия — биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты РНК и белков капсида, которые участвуют в биосинтезе ДНК фага. Латентный (скрытый) период, который длится около 15 мин.

Четвертая стадия — морфогенез фага. Данный процесс заключается в заполнении фаговой нуклеиновой кислотой пустотелых фаговых капсид и формировании зрелых вирионов (частиц фага).

Пятая стадия — выход вирусных (фаговых) частиц из разрушенной бактериальной клетки за счет фагового лизоцима, накапливающегося в процессе репродукции фага. Количество зрелых вирионов у разных клеток различно — от единиц до нескольких тысяч. Вирионы высвобождаются и вновь внедряются в новые незараженные бактерии. Процесс повторяется вновь.

При контакте умеренного бактериофага с микробной клеткой она не лизируется и становится носителем бактериофага.

Это явление получило название *лизогении*, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называют *лизогенными*. Различают монолизогенность и полилизогенность.

Бактериальная культура, образующая один вид фага, называется *монолизогенной*. Бактериальная культура, имеющая несколько видов фагов, называется *полилизогенной*. Фаг, способный лизогенировать клетку-хозяина, называется *умеренным*. При лизогении бактериофаг находится в состоянии *профага*, при котором бактериальная клетка не погибает. Профаг представляет собой геном вируса, ассоциированный с бактериальной хромосомой. Профаг, в отличие от генома вирулентного фага, воспроизводится как часть бактериальной ДНК и синхронно с ней реплицируется. Сохранение умеренных фагов в форме профагов широко распространено у сальмонелл (В. Я. Ганюшкин, 1988).

Изменение свойств бактериальной культуры под влиянием фага получило название *конверсии*. Данный феномен заключается в приобретении лизогенными бактериями способности продуцировать токсины, изменять морфологию бактерий или их антигенные свойства. Наиболее изучена фаговая конверсия при образовании соматических антигенов у штаммов *Salmonella*, принадлежащих к группе E (В. Я. Ганюшкин, 1988).

Методы выделения и титрования фагов. Субстратом для выделения фагов обычно служат испражнения животных, гной ран, сточные воды, молоко, старые культуры. Суспензии фильтруют через мелкопористые фильтры. Затем его вносят в соответствующие молодые культуры бактерий. При наличии фага в испытуемом материале бактерии растворяются, жидкость просветляется, а на поверхности агара на месте нанесения фильтратов образуются «стерильные пятна».

Бактериофаг проверяют на чистоту, специфичность, а также определяют его титр. *Титром бактериофага* называется то наибольшее разведение, которое способно вызвать лизис культуры соответствующих бактерий.

Применение бактериофага. В связи с высоким специфическим действием бактериофаги нашли широкое и разнообразное применение в ветеринарной практике. Их используют для терапии и профилактики целого ряда инфекционных болезней (гнойные инфекции, сальмонеллез и колибактериоз молодняка сельскохозяйственных животных, пуллороз цыплят и др.).

В микробиологической практике бактериофаги используют для дифференциации бактериальных культур (сибиреязвенных, стафилококковых, рожистых, сальмонеллезных и др.). С помощью фага возможна индикация патогенных бактерий в окружающей среде (в воде, выделениях животных, пищевых продуктах) с помощью реакции нарастания титра фага.

Биологическая промышленность выпускает лечебные биопрепараты из фагов в жидкой форме против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибирской язвы и др.

1.5. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Взаимоотношения организмов между собой и с окружающей средой изучает экология (от *греч.* oikos — жилище, logos — понятие, учение). Экология микроорганизмов исследует лишь отдельные части целостных экологических систем. Основной единицей в экологии служит экосистема, в нее входят как биотические, так и абиотические компоненты. *Биотические компоненты* составляют сообщество организмов, или биоценоз. Под *абиотическими компонентами* следует понимать физические и химические условия экосистемы, в которой живут организмы. Размеры микробных экосистем очень разнообразны. Это может быть, например пруд, озеро или корневая система дерева. Возможны и такие маленькие экосистемы, как ротовая полость, рубец жвачного животного или участок кишечника. В пределах экосистемы для каждого вида можно описать его место обитания.

В отличие от термина «местообитание» понятие «экологическая ниша» отражает не место в пространстве, а функцию какого-то вида или популяции в сообществе организмов. Она характеризует «профессию» вида. Стоит исходить из того, что каждый вид (или популяция) выполняет определенную функцию, которая обусловлена его (ее) потребностями в пище, подвижности, способах размножения, а также биохимическими, структурными особенностями, пределами толерантности (терпимости) к условиям среды. Может или не может какой-либо вид выполнять определенную функцию в определенной экосистеме, зависит от совокупности его свойств. Например, в рубце

жвачных животных могут расти и выполнять функцию расщепления целлюлозы только те целлюлозолитические бактерии, которые способны осуществлять это в анаэробных условиях и получать энергию в результате брожения. Далее, они должны быть толерантны к температуре внутри желудка, к присутствию жирных кислот, ферментов, аммиака, газов и других продуктов. И, наконец, должно быть обеспечено непрерывное удаление определенных продуктов брожения, например H_2 . Таким образом, для выполнения данной функции в определенной экосистеме вид должен обладать целым рядом специфических особенностей.

Первые следы жизни появились более 3 млрд лет назад. Это были микроорганизмы, которые преобладали в биосфере Земли до периода около 0,5 млрд лет назад. Прокариоты не только стояли у истоков земной жизни, положив начало развитию многообразия эукариотических форм, но продолжают и после этого свое существование.

С тех незапамятных времен установились сложные взаимоотношения между микроорганизмами, с высшими организмами растительного и животного царств, с одной стороны, и окружающей средой — с другой. В настоящее время эти взаимоотношения можно представить в виде *симбиоза*, который характеризуется следующими положениями.

Он создает благоприятные условия для обоих партнеров (взаимовыгодный симбиоз — мутуализм).

Один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого (в этом случае говорят о паразитизме, об антагонизме).

Партнеры могут не оказывать друг на друга никакого влияния (нейтрализм).

Партнерство может быть выгодно одному из организмов без оказания вредного воздействия на другого (комменсализм).

Среди разнообразнейших представителей мира микробов развились различные формы симбиотических взаимоотношений. Взаимно полезные отношения сложились между аэробными бактериями, обитающими в почве, в отделе толстого кишечника и других субстратах. Аэробные бактерии используют кислород, присутствующий в почве, тем самым создают благоприятные условия для анаэробов. В свою очередь, последние разлагают цел-

люлозу, образуя органические кислоты, которые являются источником энергии для аэробных бактерий. Такие взаимоотношения существуют между простейшими и водорослями, азотобактером и бактериями, разлагающими целлюлозу, между молочнокислыми бактериями и дрожжами в кефирных зернах и т. д.

Взаимопомощь между организмами проявляется и при различных инфекционных болезнях животных и человека. Так, гемофильные бактерии проявляют свое патогенное действие в организме в сообществе с различными сапрофитами — стафилококками, кишечной палочкой. Это свойство используют в лабораторной практике для культивирования гемофильных бактерий с использованием «баккормилок».

Наибольший практический интерес представляют антагонистические взаимоотношения между микроорганизмами. Антагонизм микробов в почве наблюдал еще Л. Пастер (1870). В 1871 г. В. А. Манассеин и А. Г. Полотебнов обнаружили антагонизм между пенициллиумом и стафилококками. В 1905 г. И. И. Мечников — между молочнокислыми и гнилостными бактериями. Его заслуга заключается в том, что он заложил основы учения об антагонизме микроорганизмов, которое в настоящее время переросло в учение об антибиотиках.

Микрофлора почвы. В почве живут и развиваются самые разнообразные микроорганизмы: амёбы, инфузории, грибы, водоросли, актиномицеты и бактерии. Из структурных частей почвы для микробиологии особый интерес представляет ее органическое вещество — гумус, состоящий из остатков животных и растительных организмов и обитающих в почве микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, так как на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовое излучение, солнечный свет, повышенная температура и др. Наиболее многочисленны микроорганизмы в верхнем слое (5–15 см), меньше их на глубине 20–30 см, и минимальное количество — на глубине 30–40 см. Однако бактерии были найдены в почве даже на глубине 5 м. Почвы, богатые бактериями, биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый га малоплодородной почвы приходится 2,5–3 т микробной мас-

сы, высокоплодородной — до 16 т. Число микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от $1-3 \cdot 10^6$ до $20-25 \cdot 10^9$.

Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны — песчаные, горные, а также почвы, лишенные растительности; содержание микробов в почве увеличивается с севера на юг. Цвет и запах почвы зависят также от состава микроорганизмов. Запах почве придают определенные виды актиномицетов. К типичным почвенным бактериям относятся *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*, *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. oedemeticus*, *C. histolyticus*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, а также термофильные, пигментные, непигментные и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80–90% всей микрофлоры почвы. В ряде случаев почва представляет собой резервуар для некоторых патогенных микробов, попадающих в нее с выделениями больных животных или трупами. Длительность выживаемости в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. Наиболее длительно живут спорообразующие микробы — возбудители столбняка, злокачественного отека, ботулизма; споры бацилл сибирской язвы могут сохраняться на протяжении десятилетий. При благоприятных условиях микробы в почве не только выживают, но и долго (недели, месяцы и даже годы) сохраняют вирулентные свойства.

Микрофлора навоза. Навоз — ценное удобрение, повышающее плодородие почв и улучшающее их структуру. Так как в нем содержится значительное количество органических соединений, он служит хорошей средой для развития сапрофитных и некоторых патогенных микробов, которые длительное время могут сохранять в нем жизнеспособность (поэтому свежий навоз в качестве удобрения не применяют). Состав микрофлоры обусловлен теми видами микроорганизмов, которые обитают в кишечнике животных.

В настоящее время приняты два способа хранения навоза — в штабелях и в специальных траншеях-навозохранилищах, что способствует интенсивному размножению в нем термофильных микробов, создающих высокую температуру, за счет которой происходит санирование навоза, т. е. гибель патогенных микробов и гельминтов, что необходимо в проведении профилактических и оздоровительных мероприятий в отношении инфекционных

и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных. Такой метод обеззараживания навоза называется *биотермическим*, он повсеместно используется в животноводческой практике.

Микрофлора воды. Изучением водных сообществ занимается гидробиология. Возрастающий дефицит пресной воды на Земле заставляет обратить серьезное внимание на процессы формирования экосистемы в водоеме и переработку водными микроорганизмами поступающих в водоем загрязнений. Вода — естественная среда обитания микробов, основная масса которых поступает из почвы, воздуха с оседающей пылью, с отбросами, стоками промышленных и животноводческих объектов и т. д. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках, нередко встречаются они в илистых отложениях океанов, морей, болот, минеральных водах. Их находят как в поверхностных слоях, так и на глубине до 10 тыс. м.

Качественный состав обитающих в воде микроорганизмов зависит в основном от свойств самой воды, поступления в нее сточных и промышленных отходов. К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bact. aquatilis*, *Proteus vulgaris*, *Spirillum* и др. Кроме сапрофитов в воде могут присутствовать возбудители инфекционных болезней животных и человека.

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда микробы вместе с пылью и капельками влаги попадают в атмосферу. Воздух — неблагоприятная среда для размножения микроорганизмов. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов. Вследствие этого микрофлора воздуха менее обильна, чем микрофлора почвы и воды.

Состав микробов воздуха весьма разнообразен — это пигментные сапрофитные бактерии (микрочкокки, сарцины), споровые (сенная, картофельная палочки и др.), актиномицеты, плесневые, дрожжевые грибы и др. Наряду с сапрофитами в воздухе встречаются условно-патогенные микроорганизмы, споры грибов из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*.

В животноводческих помещениях воздушная среда загрязняется микробами во время раздачи кормов, особенно грубых, при чихании, кашле животных, разговоре обслуживающего

персонала, также микробы попадают в воздух и с частицами высушенных фекалий животных. Доказано, что в 1 м^3 воздуха животноводческих помещений содержится до двух и более млн микробных тел, в том числе и патогенных. Степень загрязнения воздуха микроорганизмами зависит от вентиляции, конструкции помещений, скученности животных, способа их содержания и других факторов. В плохо вентилируемых помещениях число микробов в 1 м^3 воздуха в 5–6 раз больше, чем в хорошо вентилируемых.

Наибольшее количество микроорганизмов содержит воздух крупных промышленных городов. Воздух же полей, лесов, лугов, а также над водными пространствами, в удалении от населенных пунктов отличается сравнительной чистотой. Значительные изменения претерпевает микрофлора воздуха в зависимости от времени года. Максимальное количество микробов обнаруживают в летнее, а минимальное — в зимнее время.

Микрофлора организма животных. После рождения животный организм вступает в контакт с различными микроорганизмами, которые проникают в дыхательные пути и заселяют желудочно-кишечный тракт. Постоянными обитателями тела животных являются микроорганизмы, одни из которых составляют облигатную микрофлору, другие присутствуют временно, попадая из почвы, воздуха, с водой и кормом.

Микрофлора кожи. Постоянные обитатели кожи — стафилококки, стрептококки, сарцины, актиномицеты, микрококки, споры гнилостных и почвенных бацилл.

Из палочковидных форм обнаруживают кишечную, синегнойную, палочки протей и др. Также на коже присутствуют микробы из группы аэробов и анаэробов. Количество микробов на коже зависит от условий содержания животных: при плохом уходе на 1 см^2 поверхности кожи может находиться до 1–2 млрд микробных тел.

Микрофлора вымени. Микрофлору вымени составляют преимущественно микрококки (*M. luteus*, *M. flavus*, *M. caseolyticus*), стафилококки, стрептококки, коринебактерии, в частности *Corynebacterium bovis*. Поверхность кожи вымени из-за наличия мелких складок служит местом скопления разнообразных микробов, которые обитают в животноводческих помещениях, на пастбищах, в подстилке, кормах, на руках

доярки и других объектах. При недостаточно тщательной уборке и дезинфекции помещения обычно обнаруживается более 10^5 микробов на 1 см^2 кожи вымени, в результате чего вымя может быть одним из главных источников загрязнения выдоенного молока.

Из патогенных микробов на коже вымени часто встречаются возбудители маститов (*Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Staph. aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Особое значение имеют *Staph. aureus* и *Str. agalactiae*, которые наиболее часто вызывают маститы.

Микрофлора конъюнктивы. На конъюнктиве находят сравнительно небольшое количество микробов. Как правило, это стафилококки, стрептококки, сарцины, реже встречаются микоплазмы, микрококки, актиномицеты, дрожжевые и плесневые грибы.

Микрофлора дыхательных путей. У новорожденных животных в легких микроорганизмов нет. При дыхании на слизистые оболочки верхних дыхательных путей оседают из воздуха различные бактерии, актиномицеты, плесневые и дрожжевые грибы, микоплазмы и др. Постоянными обитателями слизистых оболочек носоглотки, зева в основном являются кокковые формы бактерий — стрептококки, стафилококки, микрококки.

Микрофлора пищеварительного канала является наиболее обильной. У только родившихся животных в желудочно-кишечном тракте отсутствуют микробы. Через несколько часов организм животного заселяется микрофлорой, которая в процессе жизни видоизменяется. У взрослых животных она в основном остается стабильной до конца жизни. Микрофлору пищеварительного канала принято делить на *факультативную*, которая может меняться в зависимости от вида корма и условий содержания животных, и *облигатную*, т. е. постоянную, приспособившуюся к условиям среды желудочно-кишечного тракта. К постоянной микрофлоре относятся бифидобактерии, молочнокислые стрептококки, молочнокислые палочки, кишечная палочка, целлюлозорасщепляющие, уксуснокислые, пропионовокислые и др.

Микрофлора полости рта — разнообразная. В ней обнаружено более 100 видов микроорганизмов. К постоянным обитателям ротовой полости относятся диплококки, стафилококки,

сарцины, микрококки, дифтероиды, анаэробы и аэробы, целлюлозоразрушающие бактерии, спирохеты, грибы, дрожжи и др.

Разнообразие микроорганизмов зависит от вида животных, типа кормов и состава рациона. Например, при кормлении молоком преобладают молочнокислые микробы и микрофлора молока. При кормлении грубыми кормами травоядных животных количество микробов в ротовой полости невелико, при даче им сочных кормов оно возрастает в десять раз.

Относительно бедной, как по количественному, так и по качественному составу является микрофлора желудка. Объясняется это бактерицидным действием желудочного сока и кислой средой. В содержимом желудка выживают спорообразующие микробы, кислотоустойчивые микобактерии, а также сарцины, молочнокислые бактерии, актиномицеты, плесневые грибы, энтерококки и др.

При понижении кислотности, а также при заболевании желудка, в его содержимом находят гнилостные бактерии, дрожжи, грибы, плесени и другие микроорганизмы.

В желудке свиньи главные представители микрофлоры — молочнокислые бактерии, различные кокки, сбраживающие углеводы, актиномицеты, дрожжи, спорообразующие аэробы, *Cl. perfringens*. Микрофлора желудка лошади более многочисленна и разнообразна: ближе к привратнику она бедна, в преддверии желудка микробы концентрируются в большом количестве.

Микрофлора рубца жвачных более многочисленна. Она содержит много гнилостных бактерий, возбудителей различных видов брожения. С кормом в рубец попадает огромное количество разнообразных видов эпифитной и почвенной микрофлоры, находятся они преимущественно в вегетативной форме, число их — от нескольких тысяч до 10 млн микробных тел, а по некоторым данным, до нескольких млрд в 1 мл содержимого рубца.

В рубце жвачных происходят сложные микробиологические и биохимические процессы, связанные с расщеплением питательных веществ. Особый интерес представляют целлюлозоразрушающие микробы: *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bact. succinogenes*, *C. cellobioparum*, *C. cellolyticum* и др. Эти микроорганизмы переваривают клетчатку с помощью фермента

целлюлазы до глюкозы, которая легко усваивается другими микроорганизмами. Пектиновые вещества расщепляют *Bac. macerans*, *Bac. asterosporus*, *Amylobacter*, *Cranulobacter pectinovorum*. Стрептококки (*Sir. bovis*, *Str. faecalis* и др.) сбраживают крахмал, глюкозу с образованием молочной кислоты. Пропионовокислые бактерии (*Propionipectinovorum*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Butyribacterium*, *E. coli* и др.) сбраживают лактаты с образованием пропионовой кислоты, частично масляной и уксусной, продуцируют витамины группы В. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением А, Е, D.

Микрофлора тонкого кишечника наиболее бедная. В двенадцатиперстной и тощей кишках ослабляется деятельность целлюлозных микроорганизмов. Здесь чаще всего обитают устойчивые к желчи энтерококки, ацидофильные, споровые микробы (*Bac. retiformis*, *C. perfringens*), актиномицеты, *E. coli* и др. Количественный и качественный состав микрофлоры тонких кишок зависит от вида животных и особенностей кормовых рационов.

Микрофлора толстых кишок наиболее богатая. Постоянными ее обитателями являются энтерококки, стафилококки, стрептококки, целлюлозорасщепляющие бактерии, актиномицеты, ацидофилы, спорообразующие микробы, дрожжи, плесени, гнилостные бактерии. Обилие микроорганизмов в толстых кишках объясняется наличием в них больших объемов переваренной пищи. Установлено, что треть сухого вещества фекальных масс составляют микробы. Микробиологические процессы продолжаются в отделе толстых кишок. У разных видов животных, а также птиц, микрофлора представлена разнообразными ассоциациями микробов, она может быть как постоянной, так и непостоянной.

У здоровых животных наряду с нормальной микрофлорой в ряде случаев обнаруживают и патогенные микроорганизмы — возбудители столбняка, кишечных инфекций и других болезней.

Микрофлора мочеполовых органов. На слизистой оболочке половых органов присутствуют стафилококки, стрептококки, микрококки, дифтероиды, кислотоустойчивые микобактерии (*Myc. smegmae*) и др. Наиболее частый обитатель слизистой обо-

лочки влагалища — *Bac. vaginale vulgare*, у которой резко проявляется антагонизм к другим микроорганизмам. У здоровых животных микрофлору обнаруживают только на наружных участках мочеполовых путей. Матка, яичники, семенники, мочевого пузыря в нормальном состоянии стерильны. При заболеваниях мочеполовых органов (метриты, эндометриты) микрофлора влагалища изменяется.

Таким образом, на поверхности тела животных, открытых и закрытых полостях постоянно присутствует разнообразная микрофлора, в основном безвредная, но иногда и патогенная. При нормальных условиях в организме поддерживается полезный микробиоценоз. При снижении резистентности макроорганизма условно-патогенные микроорганизмы, быстро развиваясь, вызывают болезни (пневмонии, энтериты и др.). Следует учесть, что у здоровой самки плод в матке стерилен до момента родов. Таким образом, в процессе филогенетического развития в открытых полостях животного организма сформировалась микроэкологическая система, характерная для определенного вида животного и каждого полостного органа или отдела.

В настоящее время развивается новая отрасль биологии — гнотобиология, изучающая безмикробную жизнь макроорганизмов. Проводились опыты, в ходе которых были выращены в специальных камерах путем вскармливания стерильным кормом безмикробные цыплята, крысы, мыши, морские свинки, поросята и другие виды животных.

Гнотобиоты привлекли внимание ученых в связи с необходимостью более глубокого изучения роли нормальной микрофлоры в патогенезе инфекционной патологии и механизме иммунитета. У гнотобиотов по сравнению с обычными животными недоразвита лимфоидная ткань, меньше масса внутренних органов, объем крови, понижено содержание воды в тканях.

Гнотобиология позволяет более точно выяснить роль нормальной микрофлоры в процессах синтеза витаминов, аминокислот, проявления врожденного и приобретенного иммунитета. Большое значение придается гнотобиологии при изучении космоса, условий жизни человека и животных во время полета. Пока выведены животные, свободные только от патогенных микроорганизмов (СПФ-животные).

В отличие от гнотобиотов СПФ-животные в ряде стран составляют ядро племенных и товарных ферм, свободных от инфекционных болезней. Установлено, что СПФ-поросята развиваются на 30% быстрее обычных, а смертность среди них ниже более чем наполовину.

Нормальная микрофлора. Под микроэкологической системой в широком значении понимают состояние динамического равновесия, которое определяется, с одной стороны, физиологическими и иммунологическими особенностями макроорганизма, с другой — видовым и количественным составом микробных ассоциаций и особенностями их биологических свойств.

При нормальном физиологическом состоянии взаимоотношения носят симбиотический характер, микрофлора при этом выполняет ряд весьма существенных функций.

Во-первых, нормальная микрофлора играет важнейшую роль в формировании иммунологической реактивности организма. Во-вторых, представители нормальной микрофлоры благодаря продуцированию разнообразных антибиотических соединений и выраженной антагонистической активности предохраняют органы, сообщающиеся с окружающей средой, от внедрения и безграничного размножения в них патогенных микроорганизмов. В-третьих, флора обладает выраженным морфокинетическим действием, особенно по отношению к слизистой оболочке тонкой кишки, что существенно отражается на физиологических функциях пищеварительного канала. В-четвертых, микробные ассоциации являются существенным звеном в печеночно-кишечной циркуляции таких важнейших компонентов желчи, как соли желчных кислот, холестерина и желчных пигментов. В-пятых, в процессе жизнедеятельности микрофлора синтезирует витамин К и ряд витаминов группы В, некоторые ферменты и, возможно, другие, пока неизвестные, биологически активные соединения. В-шестых, микрофлора исполняет роль дополнительного ферментного аппарата, расщепляя клетчатку и другие трудно перевариваемые составные части корма.

Нарушение видового состава нормальной микрофлоры при возникновении инфекционных и соматических заболеваний, а также в результате длительного и нерационального использования антибиотиков приводит к развитию дисбактериоза,

который характеризуется изменением соотношения популяций различных видов бактерий, нарушением усвояемости продуктов пищеварения, изменением ферментативных процессов и другими отрицательными явлениями. С целью коррекции дисбактериоза следует устранить факторы, вызвавшие этот процесс.

1.6. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

Микроорганизмам принадлежит исключительно важная роль в круговороте веществ в природе. Наиболее отчетливо биогеохимическая деятельность микроорганизмов проявляется в реакциях разложения органических веществ, в окислении водорода, метана, серы, в восстановлении сульфатов и во многих других процессах, обеспечивающих круговорот биогенных элементов.

КРУГОВОРОТ АЗОТА

Азот (N) — важнейший биогенный элемент, входящий в состав белковой молекулы каждого живого существа. Азот составляет 80% атмосферы. Столб воздуха над гектаром почвы содержит до 80 тыс. т азота. Однако ни растения, ни животные не могут его использовать в данной форме. Растения потребляют азот минеральных соединений, а животные — органических соединений. Только специфическая группа микроорганизмов обладает способностью фиксировать и строить из него все разнообразие азотсодержащих органических соединений своей клетки. Источником азота для синтеза аминокислот и белков служат нитраты почвы и воды.

Цикл превращений азота в природе с участием микроорганизмов состоит из четырех этапов: фиксации атмосферного азота, аммонификации, нитрификации и денитрификации.

Фиксация атмосферного азота. Способностью фиксировать атмосферный азот и строить из него тело своей клетки обладают микроорганизмы, получившие название *азотфиксирующих*. Они обуславливают значительное повышение плодородия почвы.

Биологическая фиксация азота в природе осуществляется двумя группами микроорганизмов: свободноживущими (несимбиотическими) и существующими в сообществе с растениями (симбиотическими или клубеньковыми). К наиболее важным свободноживущим азотфиксаторам относятся почвенные *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium pasteurianum*, *Pseudomonas fluorescens*. К активным азотфиксаторам относятся цианобактерии (синезеленые водоросли), обитающие во всех почвенно-климатических зонах.

Azotobacter — строгий аэроб, в молодой культуре он представляет собой крупные палочки длиной 4–6 мкм, подвижные, часто соединенные попарно, окрашивающиеся по Граму положительно. В старых культурах преобладают кокковые формы, окруженные общей капсулой. Азотобактерии в течение года на площади 1 га фиксируют от 20 до 50 кг газообразного азота, особенно интенсивно процесс фиксации происходит при хорошей аэрации почвы.

C. pasteurianum — анаэробы, полиморфные палочки длиной 1,5–8 мкм и шириной 0,8–1,3 мкм, подвижные, грамположительные, образующие споры, хорошо развивающиеся в почве при наличии аэробных бактерий. Микроб широко распространен в природе. Рисовые поля обогащаются азотом в основном за счет жизнедеятельности этого микроба.

P. fluorescens — аэроб, подвижный, грамотрицательный, длиной 2–5 мкм и шириной 0,3–0,4 мкм, обитающий в почвах разных зон и регионов.

К симбиотическим азотфиксаторам относятся бактерии рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии). Это подвижные палочки 1,2–3 мкм длиной и 0,5–0,9 мкм шириной, грамотрицательные, не образующие спор. При старении бактерии теряют подвижность. Клубеньковые бактерии способны внедряться в корневые волоски бобовых растений и развиваться в них с образованием на корнях клубеньков, где и происходит фиксация азота. Таким образом, между бактериями и растениями устанавливаются симбиотические отношения. Бактерии питаются органическими соединениями, синтезированными растениями, а растения получают из клубеньков связанные соединения азота. При достаточной аэрации почвы, влажности и температуре клубеньковые бактерии в течение года на 1 га могут зафиксировать

до 200 кг атмосферного азота, что значительно повышает плодородие почвы.

В хозяйствах с целью повышения плодородия почвы используют азотобактерин и нитрагин. Азотобактерин представляет собой живую культуру азотобактера, выращенную на нейтральном торфе или содовой почве. Вместе с посевным материалом его вносят под небобовые культуры (картофель, свекла). Нитрагин имеет две формы: ризотрофин и ризобин. Ризотрофин представляет собой смесь клубеньковых бактерий со стерильным торфом, ризобин (сухой нитрагин) — высушенную культуру клубеньковых бактерий с наполнителем (бентонит). Препараты вносят под бобовые культуры.

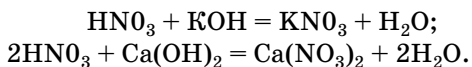
Аммонификация белков. Значительные запасы органического азота сохраняются в растительных и животных тканях. Компоненты тканей погибших растений и животных подвергаются действию микроорганизмов и азотистые соединения разрушаются с образованием аммиака. Этот процесс называют *аммонификацией*, или *минерализацией* азота. Процесс аммонификации может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях при участии разнообразных микроорганизмов: бактерий, бацилл, клостридий, актиномицетов, плесневых грибов. Расщепление белковых веществ происходит за счет протеолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами, названных *гнилостными*. Глубина расщепления белковых веществ зависит от вида микробов и условий их жизнедеятельности. За счет аэробной гнилостной микрофлоры происходит глубокий распад белка, конечными продуктами которого являются аммиак, CO_2 , сульфаты и вода. При распаде белка в анаэробных условиях образуется аммиак, CO_2 , органические кислоты, меркаптаны, а также индол, скатол, обладающие неприятным запахом. Аммонификация остатков растений, трупов, других органических субстратов ведет к обогащению почвы азотистыми продуктами. Одновременно гнилостные микробы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата.

К аэробным аммонификаторам относятся: *Bac. mycoides* — широко распространенная в природе подвижная палочка, грамположительная, образующая споры; *Bac. subtilis* — подвижная палочка, грамположительная, образующая споры;

Bac. megaterium — подвижная палочка, грамположительная. Из анаэробных микроорганизмов наиболее активны: *C. putrificum* — подвижная палочка, грамположительная, обнаруживается в кишечнике, почве, навозе; *C. sporogenes* — подвижная палочка, грамположительная, обнаруживается в почве, кишечнике.

Аммонификация мочевины. Подсчитано, что весь животный мир земного шара за сутки выделяет более 150 тыс. т мочевины. В моче содержится 47% азота, поэтому она считается одним из концентрированных азотистых удобрений. Мочевина непригодна для азотистого питания растений, и только после разложения ее микроорганизмами она становится усвояемой. Бактерии, разлагающие мочевины, называются *уробактериями* (*urea* — моча). Под действием фермента уреазы, вырабатываемого уробактериями, мочевина превращается в аммиак и CO_2 . К уробактериям относят: *Bac. probatus* — крупная палочка, подвижная, грамположительная, образующая споры; *Sporasarcina* — образует крупные шарообразные клетки, соединенные в пакеты, имеет жгутики.

Нитрификация — следующий за аммонификацией этап превращения азота микроорганизмами. Аммиак, образующийся в почве, навозе и воде при разложении органических веществ, довольно быстро окисляется сначала в азотистую, а затем в азотную кислоту. Протекает процесс нитрификации в две фазы. *Первую фазу* — окисление солей аммония до солей азотистой кислоты (нитритов) — осуществляют микроорганизмы родов *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*. *Вторую фазу* — окисление азотистой кислоты до солей азотной кислоты (нитраты) — осуществляют бактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*. Образовавшаяся азотная кислота в почве вступает в соединение с щелочами с образованием селитры:



Селитра хорошо растворяется в воде и усваивается растениями, в результате чего повышается плодородие почвы. Бактерии рода *Nitrosomonas* имеют форму палочек, подвижны, грамтрицательны, с одним жгутиком, широко распространены в почве. Род *Nitrococystil* способен образовывать зооглеи (кокковые формы микробов, окружены общей капсулой). Бак-

терии рода *Nitrospira* имеют правильную спиральную форму. Род *Nitrobacter* — полиморфные мелкие палочки, неподвижные, грамотрицательные.

Денитрификации — это процесс, обратный нитрификации. Различают прямую и косвенную денитрификацию.

Прямую денитрификацию вызывают бактерии, широко распространенные в почве, навозе, водоемах. Среди них наибольшее значение имеют: *Thiobacillus denitrificans* — палочка, не образующая спор, факультативный анаэроб; *Pseudomonas fluorescens* — подвижная палочка, грамотрицательная, образует зеленоватый пигмент; *Ps. stutzeri* — палочка, образующая цепочки; *Paracoccus denitrificans* имеет форму кокков. Денитрифицирующие бактерии восстанавливают нитраты до молекулярного азота. В почве развиваются без доступа воздуха и в щелочной среде.

Косвенная денитрификация осуществляется чисто химическим путем при взаимодействии азотистой кислоты с аминными соединениями; роль микробов сводится к образованию нитритов, главным образом из нитратов. Косвенной денитрификации способствуют самые разнообразные виды микробов, которые не только восстанавливают нитраты, но и разлагают белковые вещества с образованием аминокислот.

КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

Углерод входит в состав органических соединений, которые являются продуктами фотосинтеза. В воздухе его содержится немногим более 0,03% (по объему). Такая концентрация углекислоты (диоксида углерода) в атмосфере поддерживается относительно постоянной в результате динамического равновесия между фотосинтезом и минерализацией. О значимости круговорота углерода в природе свидетельствует расчет: весь углерод атмосферы в случае отсутствия пополнения был бы полностью исчерпан при существующей скорости фотосинтеза менее чем за 20 лет. Благодаря деятельности микроорганизмов поддерживается равновесие и круговорот CO_2 на нашей планете. При минерализации органических веществ они образуют почти столько же углерода, сколько используется растениями в процессе фотосинтеза.

Роль микробов в разложении клетчатки. В состав клетчатки (целлюлозы) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Клетчатка — наиболее распространенный полисахарид растительного мира; высшие растения на 15–50% состоят из целлюлозы. После гибели растений она подвергается разложению, в результате чего освобождается углерод. Разложение клетчатки происходит в аэробных и анаэробных условиях. В природе распад клетчатки происходит повседневно в почве, водоемах, навозе, пищеварительном тракте травоядных благодаря ферментам, которые выделяют различные микроорганизмы.

Аэробное разложение (брожение) клетчатки наиболее интенсивно происходит под влиянием следующих трех широко распространенных в природе родов микроорганизмов: *Cytophaga* — подвижные с заостренными концами палочки; *Cetacicula* — короткие с заостренными концами палочки; *Ceivirio* — длинные палочки, слегка изогнутые. Кроме того, в аэробных условиях клетчатку разлагают актиномицеты, грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др.

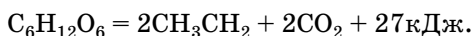
Анаэробное брожение клетчатки происходит в два этапа. *Первый этап* — клетчатка осаживается, *второй* — сахар разлагается в зависимости от типа брожения на спирты, молочную, масляную кислоты, углекислоту, водород, метан и др. Известно, что в природе осуществляется два типа анаэробного брожения клетчатки — водородное и метановое, за счет деятельности двух анаэробных бактерий-целлюлозоразрушителей: *СI. omelianskii* и *СI. cellobioparum*. Оба микроба представляют собой крупные грамположительные палочки, подвижные, образуют споры, обитают в почве и навозе. Водородное и метановое брожение клетчатки происходит в преджелудках рогатого скота при поедании большого количества зеленой массы бобовых, особенно влажной от дождя или утренней росы, что обуславливает развитие острой тимпании рубца.

Следует особо отметить, что в рубце жвачных животных присутствуют специфические облигатные бактерии, разлагающие целлюлозу кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной, молочной, муравьиной, янтарной и др.), спиртов, газов (CO_2 и H_2). Разложение целлюлозы в рубце животных осуществляют кокковидные и палочковидные бактерии:

Ruminococcus flavefaciens, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter parvum*. Указанные бактерии имеют большое значение в питании жвачных животных.

Разложение пектиновых веществ. Разрушение погибших растений происходит при активном участии микроорганизмов, разрушающих пектиновые межклеточные вещества, связывающие растительные клетки. Пектиновое брожение обуславливают микроорганизмы, которые относятся к родам *Bacillus* (*Bac. macerans*, *Bac. polymyxa*), *Clostridium* (*C. pectinovorum*, *C. pectinoliticum* и др.). Пектиновое брожение происходит при мочке льна, конопли, джута и др. Целлюлозные волокна этих растений склеены с окружающими их тканями пектином.

Спиртовое брожение. При спиртовом брожении микроорганизмы превращают углеводы (сахара) с образованием этилового спирта — основного продукта — и углекислоты с высвобождением энергии:



К возбудителям спиртового брожения относятся некоторые дрожжи, главным образом из рода *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. globusius*, *S. vini* и др.). В промышленных целях используют культурные дрожжи. По структуре накапливаемой дрожжевой массы их делят на пылевидные и хлопьевидные. У пылевидных дрожжей клетки отделены, изолированы, у хлопьевидных — склеены, образуют хлопья и оседают на дно. Пылевидные дрожжи используются для производства спирта, хлопьевидные — в виноделии и пивоварении. Дрожжи лучше развиваются в кислой среде (рН 4–6) и выдерживают до 15% спирта в растворе.

В зависимости от того, в каких условиях происходит процесс (аэробный или анаэробный), дрожжи делят на дрожжи верхового и низового брожения. Дрожжи верхового брожения (*S. cerevisior*) находятся в верхних слоях сусла, куда они поднимаются образующейся углекислотой и пеной. Брожение идет с незначительным повышением температуры (20–28°C). Через 5–7 сут. верховое брожение заканчивается, а дрожжи за 1–2 сут. до окончания брожения образуют хлопья и оседают на дно бродительных емкостей. Дрожжи низового брожения (*S. vini*) развиваются в анаэробных условиях и при более низкой температуре

(6–12°C), поэтому процесс протекает медленно (8–10 сут.). Они также оседают на дно и образуют хлопьевидный осадок. Значение спиртового брожения очень велико. Этот процесс лежит в основе виноделия, пивоварения, производства спирта, хлебопечения. Дрожжи используют и для приготовления кормового белка.

При **молочнокислом брожении** происходит распад углеводов, а также многоатомных спиртов и белков до молочной кислоты. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы — только молочная кислота или также другие органические продукты и CO_2 — молочнокислые бактерии подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные, что отражает различия в путях катаболизма углеводов.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют только одну молочную кислоту, что обусловлено кокковыми и палочковидными молочнокислыми бактериями. Кокковые формы включены в род *Streptococcus*, к которому отнесены виды *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, *Str. thermophilus*.

Str. lactis (молочнокислый стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде цепочек. Он неподвижный, грамположительный. Кроме моносахаридов сбраживает лактозу и мальтозу. Оптимальная температура развития — 30–35°C. *Str. cremoris* (сливочный стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде длинных цепочек. Образует летучие кислоты. Их используют при производстве кисломолочных продуктов. *Str. diacetylactis* образует в молоке и молочных продуктах повышенное количество летучих кислот и ароматические вещества, обладает способностью сбраживать лимонную кислоту. *Str. thermophilus* может развиваться при повышенной температуре (около 50°C), сбраживает сахарозу.

Палочковые бактерии включены в род *Lactobacterium*, характеризуются значительным разнообразием форм — от короткой кокковидной до длинной нитевидной. Располагаются в виде единичных клеток, парами или цепочками. Бактерии этого рода разделены на две группы. Представители первой группы хорошо растут при 45°C, слабо развиваются при 20°C и не растут при 15°C. К ним относятся виды *Lact. dethrueckii*, *Lact. lactis*, *Lact. bulgaricus*, *Lact. acidophilus* и др. Представители второй

группы при развитии в молоке образуют короткие цепочки. Эта группа менее активных молочнокислых палочек; хорошо развиваются при 15–38°C, оптимум для них — 30°C. К ним относятся виды *Lact. casei* и *Lact. plantarum*.

Гетероферментативное молочнокислое брожение. Вызывают представители родов *Leuconostoc*, *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*. Бактерии рода *Leuconostoc* имеют вид сферических клеток, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками. Это факультативные анаэробы, неподвижные, грамположительные, оптимум температуры 20–30°C. Род включает виды *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. citrovorum* и др.

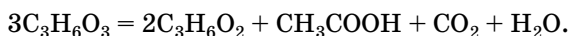
Род *Lactobacterium* включает виды *L. fermentum*, *L. brevis* и др. Обычно они встречаются на растениях, в хлебных заквасках. Это небольшие палочки, грамположительные, температурный максимум около 45°C.

К роду *Bifidobacterium* отнесены бактерии, имеющие прямые или разветвленные палочки, раздвоенные V-формы, неподвижные, грамположительные, анаэробы; температурный оптимум для них 36–38°C. Бифидобактерии — обитатели кишечника человека и животных. Типичный представитель рода — *Bac. bifidum*.

Антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенным и патогенным микробам обуславливается действием молочной кислоты, которую они продуцируют, а также образованием антибиотических веществ. *Str. lactis* синтезирует лизин, *Str. cremoris* — диплококкин, *L. acidophilus* — ацидофилин и лактоцидин, *L. plantarum* — лактолин, *L. brevis* — бревин и др.

Пропионовокислое брожение осуществляют бактерии рода *Propionibacterium*. Они представляют собой неподвижные полиморфные палочки, образующие булавовидные формы с одним концом закругленным, другим конусообразным. Располагаются они одиночно, парами, цепочками; грамположительные, спор не образуют; анаэробы, оптимальная температура роста — 30–37°C, pH — 7,0. Встречаются на растениях, в почве, в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Источниками энергии для них служат углеводы, органические кислоты, спирты и другие вещества. Пропионовокислые бактерии способны сбрасывать молочную кислоту, образовавшуюся в результате брожения, вызванного молочнокислыми бактериями. Конечные

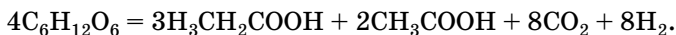
продукты пропионовокислого брожения — пропионовая и уксусная кислоты, CO_2 и вода:



Пропионовокислые бактерии используют для получения витамина B_{12} , который они образуют в значительных количествах.

Маслянокислое брожение обуславливают некоторые бактерии из рода *Clostridium*. Типичный представитель — *C. butyricum*. Это крупная палочка длиной 2–10 мкм, подвижная, грамположительная, анаэроб, образует споры. В качестве источника углерода использует моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), молочную, пировиноградную кислоты, маннит, глицерин и другие соединения. Источником азота служат разнообразные вещества — аминокислоты, аммиачные соединения и др.

Маслянокислое брожение начинается с разложения сахаров в пировиноградную кислоту. Конечные продукты из пировиноградной кислоты образуются в результате реакций, катализируемых несколькими ферментными системами. Суммарное уравнение маслянокислого брожения имеет следующий вид:



Иногда данное брожение бывает нежелательным. Например, при его развитии в заквашиваемых продуктах, силосе белковая субстанция разлагается, образуемая масляная кислота ухудшает качество корма, происходит его прогоркание. Животные плохо поедают такой корм.

Уксуснокислое брожение. Микробиологический процесс, при котором этиловый спирт окисляется до уксусной кислоты под влиянием уксуснокислых бактерий. Бактериальная природа этого процесса была установлена в 1868 г. Л. Пастером.

Уксуснокислые бактерии — короткие палочки, подвижные и неподвижные, грамотрицательные, не образующие спор, строгие аэробы. Все виды уксуснокислых бактерий объединены в род *Acetobacter*. Типичными представителями являются *A. aceti*, *A. pasteurianum* и др. *A. aceti* — короткая палочка, неподвижная, грамотрицательная, располагается цепочками. На поверхности среды (пива, не крепленных спиртом сухих вин) образует пленку. Оптимальная температура роста — 34°C.

A. pasteurianum по форме напоминает *Acetobacter aceti*. На поверхности среды образует сухую складчатую пленку. При соединении с йодом приобретает синюю окраску.

Уксуснокислые бактерии используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта в промышленных условиях. Данное брожение играет важную роль при силосовании кормов.

КРУГОВОРОТ ФОСФОРА, ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ

Фосфор имеет большое значение в жизнедеятельности организма. Без него не могут синтезироваться белки, он входит в состав ядерного вещества и многих ферментов. В почве он содержится в основном в органической, не усвояемой растениями форме и в виде трудноусвояемых минеральных соединений. Органические соединения фосфора попадают в почву вместе с растительными остатками, трупами животных и отмершими микроорганизмами. Они представлены нуклеопротеидами, нуклеиновыми кислотами и др. Роль микробов в превращении фосфора сводится к двум процессам: минерализации фосфора, входящего в состав органических веществ, и превращению фосфорнокислых солей из слабо-растворимых в хорошо растворимые, доступные для растений.

Органические и неорганические соединения фосфора разлагаются бактериями родов *Pseudomonas*, *Bacillus* (*Bac. megaterium*), грибами из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* и др.

Железо широко распространено в природе, встречается в виде органических и минеральных соединений, входит в состав животных и растительных организмов. Содержится в гемоглобине крови и дыхательных ферментах — цитохромах. При недостатке железа у животных развивается анемия, растения теряют зеленую окраску. Оно бывает в форме нерастворимого окисного Fe^{3+} и растворимого закисного Fe^{2+} . Перевод органического железа из окисного в закисное и наоборот осуществляется в основном микроорганизмами, получившими название *железобактерий*. К ним относятся нитчатые бактерии (*Leptothrix*, *Crenothrix*), бактерии рода *Galionella* и др.

Железобактерии — аэробы, встречающиеся в болотах, прудах, железистых источниках. В таких водоемах они окисляют закиси железа. В процессе деятельности железобактерий

образуется окись железа. Скопление отмерших железобактерий (гидрат окиси железа) образует на дне стоячих водоемов залежи болотной руды.

Сера в организме животных и растений входит в состав серо-содержащих аминокислот (цистеин, цистин, метионин), витаминов группы В (биотин, тиамин), много ее в волосах и перьях. Органические соединения серы в почве представлены останками животных и растений. При разложении в почве органических серосодержащих соединений, а также при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Сероводород окисляется серобактериями в безвредные, доступные для растений соединения. Серобактерии подразделяют на нитчатые, тионовые, фотосинтезирующие пурпурные и зеленые.

Нитчатые серобактерии представлены несколькими родами: *Beggiatoa*, *Thiothrix* и др. Это длинные нити, которые состоят из множества клеток, аэробы, подвижные и неподвижные, окисляют сероводород до серной кислоты.

Тионовые бактерии относятся к роду *Thiobacillus*. Это грамотрицательные палочки, подвижные, не образующие спор, окисляют серу и ее соединения.

Фотосинтезирующие зеленые и пурпурные серобактерии имеют различные морфологические формы — кокки, палочки, спириллы, живут в строго анаэробных условиях и развиваются на свету при наличии в среде сероводорода или тиосульфита натрия.

1.7. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетика — наука о наследственности и изменчивости организмов. Ее цель заключается в изучении и анализе законов передачи наследственных признаков от поколения к поколению, а также выяснении механизмов, обеспечивающих наследование на всех уровнях организации живых существ (особь, клетка).

Под наследственностью понимают способность живых организмов воспроизводить одни и те же или сходные морфологические, физиологические и биологические свойства в ряду поколений благодаря передаче материальных задатков (генов) от родителей потомкам.

МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Основная генетическая структура прокариотной клетки — это *хромосома*, представляющая собой громадную молекулу ДНК в виде двойной спирали, замкнутой в кольцо. Она является носителем генетической информации и называется *геномом*. Молекула состоит из функционально неоднородных генетических детерминант — *генов*, которые располагаются линейно вдоль хромосомы. Схема, отражающая расположение генов на хромосоме, называется генетической картой. Бактерии, как и все прокариоты, гаплоидны, т. е. генетический материал у них представлен одним набором генов. Функциональная единица наследственности — ген. Все свойства организма однозначно определены его генами, в них записана информация относительно всех свойств, присущих клетке. Они определяют особенности клеточных компонентов, их структуру и функцию. Каждый ген может существовать в виде ряда структурных форм, или *аллелей*. Совокупность аллелей всех генов клетки составляет ее *генотип*.

Синтез белка. Перед делением клетки происходит идентичная редупликация, или репликация генов. Этот процесс объясняют, исходя из модели структуры ДНК, предложенной Д. Д. Уотсоном и Ф. Криком, из механизма удвоения ДНК. Две цепи двойной спирали ДНК комплементарны друг другу. На каждой цепи из структурных элементов ДНК — дезоксирибонуклеозидтрифосфатов — синтезируется новая цепь, при этом с каждым спаривается комплементарное ему основание, так что каждая из двух новых цепей опять будет комплементарна родительской цепи. Обе новые двойные спирали состоят из одной родительской и одной вновь синтезированной цепи. Эта точная репликация ДНК гарантирует сохранение генетической информации. ДНК, будучи носителем наследственной информации, тем не менее сама не служит матрицей для синтеза полипептидов. Биосинтез белков происходит на рибосомах, которые непосредственно с ДНК не соприкасаются.

Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет *матричная*, или *информационная*, *рибонуклеиновая кислота* (мРНК или иРНК). Она состоит из одной цепи и очень напоминает одиночную цепь ДНК с тем отличием,

что тимин ДНК в РНК заменен урацилом. На одной из цепей ДНК синтезируется мРНК, причем механизм этого процесса сходен с механизмом репликации ДНК. Таким образом, при синтезе мРНК просто копируется нуклеотидная последовательность ДНК. Этот процесс называют *транскрипцией* (переписыванием).

Генетический код. Каждый ген представляет собой определенный участок молекулы ДНК. Специфическая информация, содержащаяся в гене, определена последовательностью оснований в цепи ДНК. «Алфавит», с помощью которого записана эта информация ДНК, включает четыре «буквы» основания: аденин (А), гуанин (G), тимин (Т) и цитозин (С). В мРНК вместо тимина — урацил (U). Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, обусловлена последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Каждая аминокислота определяется группой из трех соединений нуклеотидов — *триплетом*, или *кодоном*.

Аминокислоты соединяются в полипептидную цепь в порядке, определяемом триплетами мРНК. В этом процессе участвуют мРНК, транспортные РНК (тРНК), рибосомы, ряд ферментов и другие факторы. Соединение аминокислот происходит на рибосомах. К мРНК обычно присоединяется несколько рибосом, так что на одной и той же матрице одновременно синтезируется несколько полипептидных цепей.

Такой комплекс одной мРНК с рибосомами называется *полисомами*. В результате нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой закодированную «инструкцию», определяющую (при посредстве мРНК) структуру специфического белка. Таким образом, процесс биосинтеза белка происходит в два этапа: первый — транскрипция, т. е. переписывание информации с ДНК на мРНК; второй — трансляция, т. е. реализация этой информации в рибосомах, образование белковой молекулы.

НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Наследственность неразрывно связана с изменением специфических свойств под действием различных факторов. Учение о наследственности и изменчивости организмов было основано Ч. Дарвином в 1859 г., который доказал, что все существующие на земле виды животных и растений произошли путем из-

менчивости из немногих или какой-нибудь одной формы. Эволюция по Дарвину идет путем естественного отбора ненаправленных случайных изменений.

Основные законы генетики были открыты и сформулированы чешским естествоиспытателем Г. Менделем, затем подробно изучены Т. Морганом, А. Вейсманом, Н. И. Вавиловым и др.

Изменчивость основных признаков. Изучение изменчивости началось на первых этапах зарождения микробиологии, с исследований Л. Пастера, показавшего возможность ослабить вирулентные свойства у микроорганизмов при воздействии различных факторов (физических, химических, биологических). Однако на ранних этапах основное внимание уделяли изменчивости основных признаков микроорганизмов.

Изменчивость морфологических признаков. Под влиянием физических, химических, биологических агентов у многих микроорганизмов наблюдается изменение формы и размеров. Например, при добавлении стрептомицина к питательной среде клетки сальмонелл значительно удлиняются. При длительном росте бактерий в одной и той же среде возникает полиморфизм, обусловленный влиянием накопившихся в ней продуктов жизнедеятельности.

Культуральная изменчивость. Одна из форм культуральной изменчивости — феномен диссоциации, т. е. разъединение популяции бактерий и возникновение S- и R-форм. При посеве на пластинки МПА в чашках Петри чистой культуры микроорганизма образуются колонии двух основных типов: S-форма — гладкие (от *англ.* smooth — гладкий); R-форма — шероховатые (от *англ.* rough — шероховатый). Между этими формами существуют переходные M- и O-формы (слизистая и переходная). Свойства клеток колоний S- и R-форм представлены в табл. 1.

Часто вырастают очень мелкие (карликовые) колонии. Необходимо помнить, что бактерии в R-форме способны утратить специфическую агглютинабельность, что значительно затрудняет идентификацию выделенных культур. Для абсолютного большинства патогенных микробов S-форма колоний является нормой. Однако у некоторых патогенных микробов (*Bac. anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*) при шероховатой форме колоний сохраняются вирулентные свойства.

Свойства клеток колоний S- и R-форм

S-форма	R-форма
Колонии прозрачные, с гладкой блестящей поверхностью, круглые, с ровными краями, выпуклые	Колонии шероховатые, непрозрачные с неровными краями, часто морщинистые
Подвижные виды имеют жгутики	Жгутики часто отсутствуют
У капсульных видов хорошо видна капсула или слизистый слой	Капсулы или слизистый слой отсутствует
Биохимически более активны	Биохимически менее активны
У патогенных видов выражены вирулентные свойства	Слабовирулентные или авирулентные
Полноценны в антигенном отношении	Неполноценны в антигенном отношении
Чувствительны к фагу	Слабочувствительны к фагу
Взвесь клеток в физиологическом растворе гомогенная, стойкая, клетки нормальных размеров	Взвесь быстро оседает, осадок крошковидный, клетки полиморфные

По современным представлениям, в основе диссоциации лежат мутации, спонтанно возникающие в естественной среде и в условиях культивирования на искусственных питательных средах.

Изменчивость ферментативных (биохимических) свойств. Бактерии каждого вида имеют определенный набор ферментов, благодаря которым усваивают различные питательные вещества. Эти ферменты вырабатываются на определенных питательных субстратах и предопределены генотипом. В процессе жизнедеятельности бактерий обычно функционируют не все гены, ответственные за синтез соответствующих ферментов. В геноме бактерий всегда есть запасные возможности, т. е. гены, определяющие выработку адаптивных ферментов. Например, кишечная палочка, растущая на среде без углевода лактозы, не синтезирует фермент лактозу, но если пересеять культуру на среду с лактозой, то она начнет вырабатывать этот фермент. Адаптивные ферменты позволяют микробам приспосабливаться к определенным условиям существования.

Изменчивость биологических свойств. В 1880 г. Л. Пастер впервые показал, что патогенная культура возбудителя холеры кур после длительного выдерживания в условиях термоста-та потеряла патогенные свойства, но сохранила иммуногенные свойства, что было использовано с целью профилактической вакцинации против холеры кур.

В 1881 г. Л. Пастер впервые приготовил вакцину против сибирской язвы и произвел успешную вакцинацию коров. Для ее приготовления он выращивал возбудителя сибирской язвы при температуре 42,5°C в течение 12 и 24 сут., что привело к снижению его патогенности. Л. С. Ценковский, используя пастеровский тринцип, в 1883 г. приготовил живую вакцину против сибирской язвы из взвеси спор ослабленного возбудителя.

В 1885 г. Л. Пастер путем 133 последовательных интраце-ребральных заражений кроликов изменил свойства возбудите-ля бешенства. Вирус оказался авирулентным при подкожном введении и предупреждал развитие болезни у людей, покусан-ных бешеными животными. Л. Пастер назвал полученный им вирус фиксированным (*virus fixe*).

А. Кальметт и К. Герен во Франции в 1919 г. путем длитель-ных пассажей на картофельной среде с желью и глицерином при температуре 38°C значительно ослабили патогенные свой-ства возбудителя бычьего вида туберкулеза. Пересевы произво-дили каждые 14 сут. в течение 13 лет. Полученный таким обра-зом штамм микобактерий туберкулеза бычьего вида был назван вакциной БГЖ (BCG — *фр.* Bacilla Calmet — Gerен); ее с успе-хом применяют для прививок людей против туберкулеза.

Путем воздействий физических и химических факторов были получены самые разнообразные варианты микроорганизмов, имеющие большое практическое значение, так как служат «сырь-ем» в производстве живых вакцин, антибиотиков и др.

У бактерий различают фенотипическую, или модификаци-онную (ненаследственную), и генотипическую (наследственную) изменчивость.

Фенотипическая изменчивость. Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуумов называется фенотипом. Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно различаться по феноти-пу, т. е. по способу проявления наследственных признаков.

Фенотипические различия между микроорганизмами, одинаковыми по генотипу, называются *модификациями* (фенотипическими адаптациями). Они, как правило, существуют до тех пор, пока действует вызвавший их специфический фактор окружающей среды, не передаются потомкам и не наследуются ими. Это адаптивная реакция на внешние раздражители. Следовательно, роль фенотипических изменений сводится к обеспечению выживаемости микробных популяций в изменившихся условиях среды. Они выражаются в изменении формы и размера бактерий, биохимической активности и ряда других свойств.

Генотип также подвержен изменениям. **Генотипическая изменчивость** играет большую роль в эволюции организмов, так как если бы клетки не обладали способностью к изменению генотипа, то любое неблагоприятное изменение условий среды привело бы к вымиранию вида. Например, появление в культуре бактериофага вызвало бы полную ее гибель, если бы гены, определяющие фагочувствительность, не подвергались изменениям и клетки в силу этого не приобретали свойство фагоустойчивости.

В основе генотипической изменчивости лежат мутации и рекомбинации. Они происходят в структуре ДНК (генетическом аппарате клетки) и проявляются в стабильности изменений каких-либо свойств.

Под **мутацией** (от *лат. mutatio* — изменение) понимают внезапные, скачкообразные изменения наследственных свойств. Основу этого явления составляют качественные или количественные изменения последовательности нуклеотидов в ДНК, которые могут возникать под влиянием эндогенных факторов или при действии химических и физических мутагенов. Бактерии с измененными признаками называются мутантами. Различают спонтанные и индуцированные мутации.

Спонтанные (самопроизвольные) мутации возникают под влиянием неизвестных причин. Частота спонтанных мутаций мала — 10^{-5} – 10^{-10} . Один из распространенных типов спонтанных мутаций микроорганизмов — *ауксотрофность*, т. е. утрата способности к синтезу, например, лейцина, которой обладали клетки родительского типа. В этом случае мутант будет расти только на той среде, к которой добавлена эта аминокислота. Такой мутант называют *ауксотрофным по лейцину*, т. е. нуж-

дающимся в лейцине. Спонтанные мутации служат основным источником естественной изменчивости микроорганизмов и лежат в основе эволюции, обуславливая разнообразие генетического материала.

Индукцированные (направленные) мутации проявляются в результате обработки микроорганизмов специальными мутагенами (химическими веществами, физическими факторами — температурой, ультрафиолетовыми и ионизирующим излучениями и др.). В основе механизма действия мутагенов лежит их прямое или косвенное влияние на ДНК или на ее предшественников — основания.

Бактериальные мутации могут проявляться следующим образом: изменение морфологических свойств; возникновение устойчивости к лекарственным препаратам; потеря способности синтезировать аминокислоты; утилизирование углеводов и других питательных веществ; ослабление патогенных свойств и др. Например, методом направленных мутаций получены живые вакцины с ослабленной вирулентностью, которые с успехом используют для профилактики листериоза (вакцина АУФ), сальмонеллеза свиней (вакцина ТС-177) и др.

Генетические рекомбинации. Кроме мутаций, ведущих к изменению генотипа, у бактерий известны три способа передачи генетической информации от донорской клетки с одним генотипом реципиенту с другим генотипом. Эта передача осуществляется путем трансформации, трансдукции и конъюгации. В результате генетического обмена между бактериями образуются рекомбинанты, т. е. бактерии, обладающие свойствами обоих родителей. Клетки-рекомбинанты в основном сохраняют генотип бактерии-реципиента, приобретая отдельные свойства бактерии-донора. Это связано с тем, что рекомбинант несет хромосому реципиента, в которую включаются только отдельные фрагменты ДНК донора.

Трансформация (преобразование, перестройка) — изменение генома бактерии-реципиента в результате поглощения из среды свободного фрагмента ДНК клетки-донора. Данное явление у бактерий впервые выявил Ф. Гриффите. Он одновременно ввел мышам две культуры пневмококков: первая — непатогенная бескапсульная (R-штамм) и вторая — патогенная с капсулой (S-штамм), убитая нагреванием. Из крови погибших

мышей были выделены патогенные с капсулой бактерии пневмококка третьего типа. Это означало, что убитые нагреванием клетки передали способность образовывать капсулу непатогенному бескапсульному штамму. В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Картти установили, что трансформирующим веществом служит ДНК. В процессе трансформации различают пять стадий: I — адсорбция трансформирующей ДНК на поверхность микробной клетки; II — проникновение ДНК в клетку-реципиент; III — спаривание внедрившейся ДНК с хромосомными структурами клетки; IV — включение участка ДНК клетки-донора в хромосомные структуры реципиента; V — дальнейшее изменение нуклеотида в ходе последующих делений. Путем трансформации могут быть перенесены различные признаки: синтез капсульного полисахарида, устойчивость к антибиотикам, синтез ферментов и т. п. Обычно при трансформации изменяется один какой-нибудь признак. Процесс трансформации наблюдается среди бактерий различных семейств и родов.

Трансдукция — передача ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту при участии бактериофагов. Трансдуцирующими свойствами обладают в основном умеренные фаги. Размножаясь в бактериальной клетке, они включают в состав своей ДНК часть бактериальной ДНК и передают ее после проникновения клетке-реципиенту. Различают три типа трансдукции: общую, специфическую и abortивную. При *общей трансдукции* фаг выступает в качестве «пассивного» переносчика генетического материала бактерий, захватывая в свою головку фрагмент бактериальной ДНК вместо своего генома. Эти фаги получили название *дефектных фагов*. Один и тот же фаг может трансдуцировать различные признаки: ферментативную активность, устойчивость к антибиотикам, подвижность, серологические и вирулентные свойства и др.

Специфическая трансдукция осуществляется фагами, геном которых при лизогенизации соединяется только с определенным участком хромосомы бактерий, т. е. фаг имеет определенную точку прикрепления на хромосоме. Поэтому при освобождении такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы бактерий и передает ее реципиентной клетке, принося ей новый ген.

Абортивная трансдукция осуществляется переносом фагом участка ДНК клетки-донора в клетку-реципиент, которая не включается в ее геном, а следовательно, проявление нового признака не наблюдается.

Конъюгация (спаривание) — передача генетического материала клетки-донора клетке-реципиенту при непосредственном контакте. Способность бактериальной клетки конъюгировать связана с наличием в ней полового фактора F (от *англ.* fertility — плодовитость) — внехромосомной автономной детерминанты. Конъюгирующие клетки соединяются через конъюгационный мостик, образованный половой ворсинкой F-пили донорской клетки. Перенос генетического материала происходит в одном направлении — от донорской (мужской F⁺) клетки к реципиентной (женской F⁻). При контакте клетки F⁺ передают бактерии-реципиенту плазмиду F в виде цельной структуры, причем бактерия F⁺ не теряет своей донорской способности, в то же время клетки F⁻ превращаются в донорские, получая F-фактор, и становятся способными к конъюгации. Среди популяции клеток-доноров есть бактерии, которые могут при конъюгации передавать и фрагменты бактериальной хромосомы. Эти штаммы получили название Hfr (от *англ.* high frequency of recombination) — бактерии с высокой частотой рекомбинации. У бактерий Hfr половой фактор находится в хромосоме. При конъюгации клеток Hfr и F⁻ происходит разрыв хромосомы бактерии в месте прикрепления F-фактора.

Таким образом, все три процесса генетической рекомбинации у бактерий — трансформация, трансдукция и конъюгация — различны по форме, но одинаковы по существу, так как в результате каждого процесса происходит перенос фрагмента ДНК от одной клетки к другой. При трансформации в бактерию-реципиент входит свободная ДНК; при трансдукции фаг захватывает участок хромосомы бактерии-донора и передает реципиенту; в процессе конъюгации происходит перенос фрагмента ДНК при образовании цитоплазматического мостика между бактериями.

Кроме хромосомы у некоторых бактерий присутствуют дополнительные внехромосомные генетические детерминанты, названные плазмидами. У бактерий обнаружено большое разнообразие плазмид, среди которых наиболее изучены половой

фактор (F), фактор множественной лекарственной устойчивости (R), факторы бактериоциногении (Col), плазмиды, контролирующие у *E. coli* синтез энтеротоксина (H1y), детерминирующие синтез поверхностных антигенов (K88, K99) и др. Плазмиды расположены в цитоплазме, имеют кольцевую структуру и способны к саморепликации. Общее для плазмид свойство заключается в том, что они придают клетке дополнительные, не обязательные для нее функции, но чаще всего выгодные. Они могут быть потеряны бактерией, однако это не влияет на основные свойства клетки. Плазмиды (F-фактор и др.), способные интегрировать в хромосому и реплицировать вместе с ней, получили название *эписом*.

Большинство плазмид обладают способностью передаваться от бактерии к бактерии при конъюгации. Такие плазмиды получили название *конъюгативных*, или *трансмиссивных*. Они могут также передаваться при трансдукции и при обычном делении клетки.

Фактор множественной лекарственной устойчивости. R-фактор — типичная плазида, представляющая собой двуспиральную молекулу ДНК, в которой определены гены, ответственные за саморепликацию и перенос резистентности в реципиентную клетку, — фактор переноса устойчивости RTF (от *англ.* resistance transfer factor) и отдельные гены, обозначаемые буквой r (от resistance), детерминирующие устойчивость к конкретному антибиотику. R-фактор может передаваться при трансдукции и обычном делении бактериальной клетки. Механизм, определяющий способность R⁺-бактерий превращать антибиотики в неактивную форму, связан с действием на антибиотики особых специфических ферментов, синтез которых детерминруется R-плазмидой.

Плазмиды Col (*англ.* colicinogeny — колициногенность) детерминируют синтез белковых веществ, называемых *колицинами*, которые подавляют рост и размножение чувствительных к ним бактерий, в первую очередь близкородственных. Этот феномен впервые обнаружен в 1925 г. А. Gratia у штамма *E. coli*, поэтому и назван колициногией. В дальнейшем было установлено, что и многие бактерии других видов выделяют белковоподобные вещества, летальные для близких видов. Вещества эти получили название бактериоцинов, а феномен — бактериоциногении.

E. coli детерминируют синтез различных типов колицинов, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита: А, В, С, D и т. д. Механизм действия колицинов заключается в следующем: колицины адсорбируются на чувствительных клетках (лишенных Col-фактора) и, не проникая внутрь клетки, вызывают нарушение метаболизма, что приводит клетку к гибели.

Носительство плазмид — широко распространенное явление среди микроорганизмов, их наличие дает клетке определенные преимущества. Плазмиды играют важную роль в эволюции бактерий, участвуя в процессе естественного отбора.

Принципы генетической инженерии. В формировании генетической инженерии главную роль сыграла генетика микроорганизмов, а именно достижения современной молекулярной генетики микроорганизмов и открытые ею закономерности, ее идеи и методы.

Возникновение генетики микроорганизмов можно датировать 1940-ми гг. Первые опыты по конструированию рекомбинантных молекул ДНК вне живой клетки относятся к началу 1970-х гг. Таким образом, понадобилось всего 30 лет, чтобы преодолеть путь от первых опытов с грибами, бактериями и фагами в качестве генетических объектов до расшифровки тонкой структуры их генетического материала, принципов его организации и функционирования.

Первым объектом исследования генетики микроорганизмов была плесень *Neurospora crassa*, следующими были грибы, бактерии и вирусы бактерий (бактериофаги). Наиболее удачным оказалось использование штамма К-12 *E. coli*, так как эта бактериальная структура содержала, как выяснилось позднее, профаг А — будущий классический объект исследования молекулярной генетики.

Таким образом, уже через несколько лет стало очевидно, какие огромные перспективы открывает применение микроорганизмов для генетических исследований в силу простоты их организации, быстроты размножения и возможности исследования синтетических питательных сред.

В 1952 г. в опытах на сальмонелле Н. Циндер и Э. Ледерберг описали перенос генетического материала посредством бактериофага.

Значение этих исследований, а также дальнейшего изучения генетической трансформации заключалось в разработке на их основе методов генетического анализа. С их помощью в течение нескольких лет были построены генетические карты у *E. coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bac. subtilis*, т. е. установлено относительное расположение на хромосоме различных генетических локусов. Аналогичный путь прошла генетика бактериофагов, разработавшая свои методы генетического анализа и построения генетических карт. В результате этих исследований в организации генетических локусов у бактерий и бактериофагов были выявлены общие закономерности: наличие одной группы сцепления (хромосомы) и групповое расположение генетических локусов с родственными функциями.

Методы картирования генов и их мутаций снабдили исследователей тонким инструментом анализа основных генетических процессов, протекающих в бактериальных клетках. Блестящих результатов благодаря им достигли А. Львов и Ф. Жакоб в своих исследованиях генетического материала в процессе биосинтеза белка.

На основании этих исследований была предложена первая модель оперона. Согласно ее концепции, структурные гены бактерий организованы в функциональные единицы, находящиеся под контролем генов-регуляторов. Продукты последних — репрессоры — подавляют активность структурных генов, координированно регулируя синтез их белковых продуктов. На проксимальном конце оперона расположены регуляторные участки — операторы, обеспечивающие взаимодействие с репрессорами.

Исходя из модели оперона, Ф. Жакоб и Ж. Моно выдвинули ряд предположений. Одно из них заключалось в том, что при присоединении структурных генов одного оперона к регуляторным участкам (промотору и оператору) другого характер регуляции первого должен измениться. Действительно, в результате выбрасывания с помощью делеции участка хромосомы *E. coli*, разделяющего два оперона — лактозный и пуриновый, возник «гибридный» оперон, в котором синтез ферментов утилизации лактозы перестал подчиняться собственной системе контроля. Синтез этих белков не индуцировался более галактозидами, но подавлялся при добавлении пуринов.

В конце 1950-х — начале 1960-х гг. в результате успехов генетики микроорганизмов и молекулярной биологии сформировалось новое научное направление — молекулярная генетика. Одна из наиболее ярких страниц этого периода связана с открытием и расшифровкой рестрикции и модификации ДНК. Большой вклад в эту область внес В. Арбер. Он доказал, что в клетках бактерий, ограничивающих размножение фага γ , синтезируются два фермента. Один из них, обозначенный как эндонуклеаза, расщепляет чужеродную ДНК, проникшую в клетку. Другой, названный метилазой, модифицирует проникающую ДНК путем метилирования нескольких пар нуклеотидов, тем самым делая ДНК устойчивой к действию эндонуклеазы. В. Арбер сформулировал и основные принципы работы систем рестрикции — модификации, выработанные в процессе эволюции для защиты от проникновения неродственной ДНК.

Исследования В. Арбера привлекли к широкому поиску ферментов рестрикции у других бактерий и к разработке методов «нарезания» молекул ДНК на фрагменты, сыгравших решающую роль в развитии генетической инженерии.

Благодаря совершенствованию приемов и методов бактериальной генетики бактериофагов стало возможным перемещение генетического материала как в пределах одного генома, так и между разными геномами.

Манипулирование генетическим материалом в живой клетке, т. е. генетическая инженерия в условиях *in vivo*, достигло своего апогея в блестящей работе Бэквиса, Шапиро и др., которые выделили фрагменты ДНК, несущие гены утилизации лактозы *E. coli* (лактозный оперон), в химически чистом виде.

С целью связать достижения бактериальной генетики в манипулировании генами с методологией генетической инженерии (конструирование гена *in vitro*) рассмотрим модель репликаона и ее значение для реконструирования рекомбинантных молекул ДНК. Ф. Жакоб и Ж. Моно предположили, что каждая генетическая структура, будь то хромосома, плаزمид или бактериофаг, составляет *единицу репликации* или *репликон*, который построен из двойной цепи ДНК, замкнутой в кольцо, и имеет генетические детерминанты, необходимые для его репликации. Последняя начинается в одном определенном участке молекулы и распространяется вдоль ее длины. Репликация

хромосомы бактерий начинается с одной точки и происходит двунаправленно. Гипотеза репликаона позволила объяснить известные факты, что фрагменты хромосомы, перенесенные в другие клетки с помощью трансформации, трансдукции или конъюгации, не способны самостоятельно реплицироваться и могут передаваться дочерним клеткам только после их включения в хромосому. Именно в этом и состоит значение модели репликаона для генетической инженерии. Клонирование генов может быть осуществлено только путем их включения в состав генетической структуры, обладающей собственным аппаратом репликации. Такая структура, обычно плаزمиды или ДНК фага, именуется *векторной молекулой*.

Методом генетической инженерии можно решить следующие задачи:

1) генетически изменить микроорганизмы с целью увеличения количества вырабатываемого ими необходимого продукта (аминокислот, ферментов, полисахаридов и др.);

2) осуществить перенос соответствующих генов млекопитающих и человека в микроорганизмы (бактерии, дрожжи) для синтеза с их помощью специфических белков, используемых в лечебно-профилактических целях (гормоны, вакцины, интерферон, ферменты, иммуноглобулины и др.);

3) генетически изменить высшие растения для поднятия их продуктивности (урожайности, калорийности, устойчивости к различным внешним факторам). Особое внимание уделяется получению растений, несущих гены азотфиксации и не нуждающихся в азотных удобрениях;

4) генетически изменить соматические клетки человека, страдающего наследственными заболеваниями, с помощью трансформации их *in vitro* или *in vivo* рекомбинированными ДНК, содержащими неповрежденный ген (генная терапия наследственных болезней).

Для создания генетически измененных организмов необходимо получить индивидуальный ген, кодирующий необходимый признак. Далее нужно подобрать вектор — молекулу ДНК, способную к самостоятельной репликации в клетке-реципиенте, создать рекомбинантную молекулу ДНК.

То есть соединить выделенный ген с вектором и ввести в подходящую клетку-реципиент.

На стыке микробиологии, генетики и молекулярной биологии бурно развивается новая отрасль науки и производства, называемая *биотехнологией*. Она использует методы генетической и клеточной инженерии для получения биологических веществ с заданными свойствами по производству антибиотиков, витаминов, аминокислот, вакцины, моноклональных антител, диагностикумов и т. д. Производство этих препаратов с использованием микробиологического синтеза более выгодно, чем химическим путем, некоторые препараты (бактериальные белки и ферменты) можно получить только путем микробиологического синтеза. Следует подчеркнуть, что возможности микробиологического синтеза весьма велики, так как время деления (удвоения) микробной клетки составляет всего 0,3–2,0 ч, скорость образования биомассы у растений в 500 раз, а у животных в 1000 раз меньше, чем у микроорганизмов. Одна микробная клетка синтезирует около 100 тыс. молекул белка в минуту. Современный органический синтез не обладает такой высокой производительностью.

У некоторых микробов обмен веществ направлен не на рост и размножение, а на синтез какого-либо вещества. Так, например, высокопродуктивный мутант для синтеза пенициллина образует за цикл развития до 0,5 кг пенициллина на каждый кг биомассы. Некоторые микроорганизмы могут синтезировать витамин В₁₂ в количествах, превышающих их жизненные потребности в 100–200 раз. У продуцентов витамина В₂ масса синтезированного витамина достигает 20% от массы клетки. В связи с этим целенаправленному поиску продуцентов, т. е. выбору штамма, обладающего наивысшей продуктивностью, придается большое значение.

Методы отбора включают в себя достижения молекулярной генетики и геной инженерии. Большинство биологических препаратов, используемых в настоящее время для профилактики инфекционных болезней животных, производят с использованием биотехнологии. Так, например, вакцины против многих инфекционных болезней изготавливают в промышленных масштабах из ослабленных штаммов возбудителей путем выращивания их в реакторах по соответствующей программе.

Достижения молекулярной биологии по изучению роли нуклеиновых кислот в процессах жизнедеятельности привели

к разработке совершенно новых методов диагностики болезней животных и человека на основе уникальных свойств ДНК и РНК. Это методы молекулярной гибридизации (ДНК-зонды) и полимеразной цепной реакции (ЦПР).

Таким образом, полученные с помощью биотехнологии вещества находят широкое применение в самых различных отраслях медицины, ветеринарии, сельского хозяйства и промышленности, а по мере развития молекулярной биологии и генной инженерии область и масштабы их использования значительно расширяются.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. В чем заключается отличие клетки прокариотов от клетки эукариотов?
2. Какие таксономические категории используют при классификации микроорганизмов?
3. Какую номенклатуру используют для обозначения видов микроорганизмов?
4. Какое понятие вкладывается в термин «вид» микроорганизмов?
5. Что такое штамм и клон?
6. Что такое чистая культура микроорганизма?
7. Каковы особенности строения прокариотной клетки?
8. Перечислите морфологические формы бактерий.
9. Что такое протопласты, сферопласты и L-формы бактерий?
10. Каковы особенности строения актиномицетов?
11. Каковы морфологические особенности риккетсий и микоплазм?
12. В чем особенности строения микроскопических грибов? Какие критерии используют для дифференциации дрожжевой клетки от плесени?
13. Какие минеральные вещества входят в состав клетки микроорганизмов?
14. Что представляют собой ферменты микробных клеток и какое участие они принимают в жизнедеятельности клетки?
15. Назовите гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты.
16. Назовите типы питания микробов и раскройте их сущность.
17. На чем основана классификация микробов по типу дыхания?
18. Сформулируйте понятие о факультативных анаэробах, микроаэрофилах, анаэробах, аэробах.
19. Перечислите способы размножения микроорганизмов.
20. Что такое стерилизация, асептика, антисептика, дезинфекция, пастеризация?

21. В чем состоит механизм действия физических, химических и антибиотических веществ на бактерии?
22. Расскажите, на чем основана микробиологическая оценка качества дезинфекции.
23. В чем суть феномена бактериофагии?
24. Какова схема основных этапов взаимодействия фага с бактериальной клеткой?
25. Назовите основную микрофлору почвы.
26. Какая микрофлора присутствует в воде?
27. Какая микрофлора присутствует в воздухе?
28. Какова основная микрофлора кожи и дыхательных путей?
29. Какую микрофлору рубца вы знаете и чем характеризуется ее роль в пищеварении?
30. Назовите микрофлору толстого отдела кишечника.
31. Расскажите о цикле превращений азота в природе.
32. Какие микроорганизмы обуславливают аммонификацию (минерализацию) белков?
33. Какие микроорганизмы обуславливают нитрификацию и денитрификацию?
34. Какие микроорганизмы обуславливают аэробное и анаэробное разложение клетчатки?
35. Назовите микроорганизмы, разлагающие целлюлозу в рубце жвачных животных.
36. Что вы знаете о микроорганизмах, вызывающих спиртовое брожение?
37. Расскажите о микроорганизмах, вызывающих гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение.
38. Назовите микроорганизмы, вызывающие пропионовокислое и масляное брожение.
39. Какие микроорганизмы осуществляют превращение фосфора, железа и серы в природе?
40. Сформулируйте цели и задачи генетики микроорганизмов.
41. Что вы понимаете под термином «ген»?
42. Что вы понимаете под термином «диссоциация культуры»?
43. Что означает термин «фенотипическая изменчивость»?
44. Что означает термин «генетическая изменчивость»?
45. Что вы понимаете под термином «мутация»?
46. Что такое трансформация, трансдукция и конъюгация?
47. Что такое колицины (бактериоцины)?
48. Что такое плазмиды?
49. Назовите задачи, которые решает генетическая инженерия.

2.1. ПАТОГЕННЫЕ КОККИ

СТАФИЛОКОККИ

Стафилококки (*Staphylococcus*) — сферические грамположительные неподвижные аспорогенные бактерии рода *Staphylococcus* из семейства *Micrococcaceae*. В 1976 г. Международным комитетом по таксономии стафилококков официально утверждены следующие названия трех известных на тот момент видов: *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Стафилококки имеют большое значение в инфекционной патологии животных: практически любой орган и любая ткань могут быть поражены этими микробами. Они вызывают фурункулы, маститы, эндометриты, бронхиты, пневмонию, менингиты, септицемию, стафилококкоз птиц, энтероколиты и пищевые токсикозы. Стафилококки среди микроорганизмов, вызывающих пищевые токсикозы, занимают одно из первых мест.

Морфология. Стафилококки — округлые клетки диаметром 0,5–1,5 мкм. В препаратах из гноя и молодых бульонных культур они располагаются одиночно, небольшими кучками; в мазках из агаровых культур — одиночно или в виде отдельных скоплений неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Грамположительные, спор и капсул не образуют.

Культивирование. Это факультативные анаэробы. Они хорошо растут на обычных питательных средах при 35–40°C, оптимум pH 7,0–7,5. Добавление к питательной среде глюкозы или крови ускоряет рост стафилококков. Характерное свойство большинства штаммов — способность расти в присутствии 10% хлорида натрия и 40% желчи, что используют при индикации и идентификации.

На МПА они образуют круглые колонии с ровными краями диаметром 2–3 мм. Колонии могут быть окрашены в золотистый или оранжевый цвет, встречаются и бесpigментные штаммы. Рост в МПБ сопровождается диффузным помутнением с последующим выпадением рыхлого осадка.

Биохимические свойства. Стафилококки ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, глицерин, маннит и не разлагают дульцит, салицин, инулин, раффинозу. Восстанавливают нитраты в нитриты; продуцируют каталазу, фосфатазу, уреазу, а патогенные штаммы — аргиназу.

Протеолитическая активность у стафилококков варьирует в значительной степени: свертывают и пептонизируют молоко, разжижают желатин, выделяют аммиак и сероводород, не образуют индол.

На кровяном агаре патогенные штаммы стафилококков образуют значительную зону гемолиза эритроцитов.

Патогенные стафилококки синтезируют и секретируют высокоактивные экзотоксины и ферменты. К экзотоксинам относятся гемотоксины (стафилолизины), лейкоцидин и энтеротоксины.

К гемотоксинам относятся α -, β -, γ -, δ -гемолизины. Все стафилококковые гемолизины, мембранотоксины способны лизировать эритроциты.

Энтеротоксины — термостабильные полипептиды, образуются при размножении энтеротоксигенных штаммов стафилококков в питательных средах, продуктах питания (молоко, сливки, творог и др.), кишечнике. Устойчивы к действию пищеварительных ферментов. Энтеротоксины вызывают пищевые токсикозы человека, к ним чувствительны кошки и собаки, особенно котята и щенки.

Основная роль в инфекционной патологии животных и человека принадлежит *S. aureus*, в меньшей степени *S. epidermidis* и в отдельных случаях *S. saprophyticus*. Главнейшие факторы, определяющие патогенность этих бактерий, — это способность продуцировать экзотоксины и ферменты коагулазу, фибринолизин и гиалуронидазу, а также ДНК-азу.

Патогенные стафилококки кроме гемолитической и лецитиназной активности обладают способностью коагулировать плазму, вызывать некроз кожи.

Устойчивость. Стафилококки — относительно резистентные микроорганизмы. Прямые солнечные лучи убивают их только через несколько часов. В пыли они сохраняются 50–100 сут., в высушенном гное — более 200 сут., в бульонной культуре — 3–4 мес., на полужидком агаре — 6 мес. В жидкой среде при 70–80°C погибают через 20–30 мин, при 85°C — через 30 мин, при 100°C — за несколько секунд. Из дезинфектантов 1%-ный раствор формалина и 2%-ный раствор гидроксида натрия убивают их в течение 1 ч, 1%-ный раствор хлорамина — через 2–5 мин. Стафилококки обладают высокой чувствительностью к бриллиантовому зеленому и пиоктанину.

Лабораторная диагностика. Исследуют раневой экссудат, гной абсцессов, ран, молоко при маститах, кровь из яремной вены при септицемии, рвотные массы при отравлениях.

Мазки из патологического материала окрашивают по Граму и микроскопируют. Однако прямая микроскопия позволяет дать только предварительный ответ. Одновременно с этим материал сеют в чашки с кровяным, молочно-солевым и желточно-солевым агаром.

Патогенные штаммы на кровяном агаре образуют вокруг колоний зону гемолиза. На чашках с молочно-солевым и на обычном МПА отмечается образование пигмента. На желточно-солевом агаре большинство патогенных стафилококков образуют лецитовителлазную реакцию, характеризующуюся образованием вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. Для выделения чистой культуры из характерной колонии делают отсев на МПА. Чистую культуру микроскопируют, после чего ставят реакцию плазмокоагуляции с цитратной плазмой крови кролика.

S. aureus, в отличие от других видов, ферментирует маннит в анаэробных условиях. Патогенные стафилококки кроме гемолитической и лецитиназной активности обладают способностью коагулировать плазму, вызывать некроз кожи и разрушать ДНК клеток тканей. Гибель же кролика свидетельствует о наличии летального действия токсина.

Фаготипируют выделенные культуры с помощью международного набора стафилококковых фагов, который включает в себя 22 типа фага. Энтеротоксины в пищевых продуктах и куль-

турах определяют в РДП со стафилококковыми антисыворотками к энтеротоксинам А, В, С, D, Е, F.

В связи с широким распространением штаммов стафилококков, резистентных к лекарственным препаратам, проводят определение чувствительности выделенных культур к антибиотикам на плотной среде методом бумажных дисков (или диффузии в агар), что очень важно для назначения эффективной антибиотикотерапии.

Иммунитет при стафилококковых инфекциях преимущественно анитоксический, слабой напряженности и непродолжительный, что обуславливает частые рецидивы.

Биопрепараты. Предложены очищенный адсорбированный стафилококковый анатоксин и аутовакцина, прогретый при 70–75°C смыв агаровой культуры стафилококка, выделенного из организма больного животного. Иногда местно применяют фаг.

СТРЕПТОКОККИ

Стрептококки (*Streptococcus*) были выделены из тканей людей, больных рожей, и при раневых инфекциях в 1874 г. Т. Бильротом, а описаны при сепсисе Л. Пастером в 1879 г. и А. Огстоном в 1881 г. Чистая культура стрептококков была изучена Ф. Фелейзенем в 1883 г. и А. Розенбахом в 1884 г.

Стрептококки являются постоянными обитателями полости рта и верхних дыхательных путей человека и животных. Большое количество альфа- и бета-гемолитических стрептококков выделяются в окружающую среду при кашле и чихании, наличие их в определенных объемах воздуха позволило некоторым исследователям рекомендовать данные стрептококки в качестве санитарно-показательных бактерий.

Патогенные стрептококки у животных и человека заселяют слизистые оболочки, кожу и проявляют свою патогенность при снижении общей резистентности организма животного или отдельных тканей (при травме, ожоге и т. п.).

В естественных условиях стрептококки являются возбудителями мыта лошадей, а также нагноительных процессов у многих видов животных (артриты, флегмоны, маститы, эндометриты, диплококковая септицемия молодняка). Иногда они обуславливают осложнение вирусных и бактериальных инфекций.

Морфология. Стафилококки — шаровидные или овальные клетки диаметром 0,5–2 мкм, грамположительные, расположенные цепочкой, неподвижные, не образующие спор.

Культивирование. Они относятся к факультативным анаэробам, растут при 37°C и рН среды 7,6–7,8. Лучше образуются в средах, содержащих кровь или сыворотку крови. На МПА стрептококки растут в виде мелких прозрачных или серовато-белых колоний; на кровяном агаре они создают зону гемолиза. На сахарном бульоне растут с образованием пристеночного кольца, мелкозернистого осадка, при этом сам бульон остается прозрачным.

Ферментативные свойства. Стрептококки обладают определенными сахаролитическими свойствами, расщепляют глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит (не всегда) и мальтозу с образованием кислоты. Протеолитические свойства выражены слабо, не разжижают желатин, свертывают молоко.

Все стрептококки разделены на три группы по гемолитической активности на агаре с кровью барана: гемолитические, зеленящие и не дающие зону гемолиза.

Токсины и факторы патогенности. Патогенные стрептококки продуцируют экзотоксины различного действия: гемолизин, лейкоцидин, летальный токсин (некротоксин).

Все стрептококки подразделены на 17 серологических групп, обозначаемых латинскими буквами в порядке алфавита. Практический интерес представляют серогруппы А, В, С, D, Е и F. Кроме экзотоксинов патогенные стрептококки продуцируют ферменты — гиалуронидазу, фибринолизин, дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу, нейраминидазу, протеиназу, стрептокиназу, амилазу, липазу, а также термостабильные эндотоксины.

Устойчивость. Они довольно устойчивы, погибают через 30 мин при температуре 60°C. В высушенном гное и мокроте сохраняются месяцами, в навозе — один месяц. Стрептококки в течение нескольких дней могут сохраняться на предметах, окружающих больного, и в пыли. После высыхания они сохраняют жизнеспособность, а через несколько часов пребывания в воздухе теряют свою вирулентность. Обычные концентрации дезинфицирующих препаратов убивают стрептококки через 15–20 мин.

Лабораторная диагностика. В лабораторию посылают патологический материал (гной, гнойный экссудат, маститное

молоко, паренхиматозные органы). Диагноз ставят на основании микроскопии мазков, выделения чистой культуры и результатов биопробы.

Биопрепараты. Для специфической профилактики диплококковой инфекции применяют полужидкую формолвакцину, ассоциированную вакцину против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят, инактивированную вакцину из стрептококковой серологической группы С. Для лечения применяют гипериммунную сыворотку против диплококковой септицемии телят, ягнят, поросят.

2.2. ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА И ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА

Микроорганизм рода *Mycobacterium* (от лат. *mycos* — гриб, *bacterium* — палочка) включает в себя 49 видов как патогенных, так и непатогенных микобактерий. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), быков (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*), мышей (*Myc. murium*), у холоднокровных — рыб, змей, лягушек, черепах (*Myc. poikilotermum*), а также возбудители проказы (*Myc. leprae*) и паратуберкулеза крупного рогатого скота (*Myc. paratuberculosis*).

Патогенные микобактерии вызывают туберкулез — инфекционную, хроническую болезнь, протекающую чаще у крупного рогатого скота, свиней, кур, реже у коз, собак, уток и гусей и как исключение у лошадей, овец, кошек. Патологоанатомически он характеризуется образованием в различных органах и тканях множественных туберкул (бугорков), подвергаемых творожистому перерождению, обызвествлению. Возбудители туберкулеза человека и крупного рогатого скота были открыты Р. Кохом в 1882 г., а возбудитель туберкулеза птиц установил Н. Ф. Гамалея в 1891 г.

Морфология. Микобактерии туберкулеза — стройные или слегка изогнутые, неподвижные, грамположительные палочки; спор и капсул не образуют. Размеры клеток могут значительно варьировать в зависимости от вида и возраста культуры,

длина — 1,5–5 мкм, ширина — 0,2–0,5 мкм. Они относятся к кислото-, спирто- и щелочеустойчивым микроорганизмам. В препаратах из патологического материала для микобактерий характерно расположение в виде небольших скоплений.

Микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов, вследствие чего трудно окрашиваются анилиновыми красителями, но хорошо воспринимают краску после протравливания и применения концентрированного карболового фуксина при подогревании. На этом основан метод окраски микобактерий по Цилю–Нильсену.

Для быстрого обнаружения микобактерий в различных объектах существует люминесцентный метод, в основе которого лежит их способность окрашиваться люминесцентными красителями и издавать желто-зеленое свечение под воздействием ультрафиолетового облучения, что позволяет обнаружить микобактерии даже при небольшой концентрации.

Культивирование. Микобактерии туберкулеза относятся к строгим аэробам. На питательных средах они растут медленно, поэтому применяются специальные элективные среды, на которых данные микобактерии дают более быстрый и обильный рост. Оптимальной температурой для *Myc. tuberculosis* является 37–38°C, для *Myc. bovis* — 38–39°C, для *Myc. avium* — 39–41°C.

Для первичного выделения культур оправдали себя только плотные яичные среды Петраньяни, Гельберга и др. Для изучения биохимических свойств микобактерий целесообразно применять безбелковые синтетические среды Сотона или Моделя.

На МПБ с глицерином они растут в виде поверхностной пленки: бычий тип образует тонкую пленку, человеческий — толстую и морщинистую, птичий — мощный слизистый слой, сам бульон при этом остается прозрачным. Культуральные свойства на плотной среде у микобактерий также различны: *Myc. bovis* образует бородавчатые колонии, *Myc. tuberculosis* растет в виде сухого тонкого налета, а *Myc. avium* сравнительно быстро образует округлые слизистые колонии.

Биохимические свойства. У микобактерий туберкулеза обнаружены ферменты эстераза, липаза, дегидраза, уреазы, перигалоза, каталаза и протеолитические ферменты. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углево-

ды, лецитин и фосфатиды. У молодых культур микобактерий сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

Устойчивость. Микобактерии туберкулеза отличаются устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли микобактерии сохраняют жизнеспособность от 2 до 7 мес., в гниющем материале — 76–167 дней и более; в проточной воде — 8–12 мес., в почве — до 2–3 лет. Низкие температуры не влияют на их жизнеспособность.

Микобактерии весьма чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, так, в жаркие дни в мокроте они погибают через 1,5–2 ч. Особенно губительно для них ультрафиолетовое излучение.

Большое значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде они погибают при 60°C в течение 1 ч, при 65°C — через 15 мин, при 70–80°C — через 5–10 мин. В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9–10 сут., в масле — недели, в некоторых сырах — до нескольких месяцев, а в скисшем молоке гибнет под воздействием молочной кислоты. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими непоробразующими бактериями более устойчивы к дезинфицирующим веществам, так 5%-ный раствор фенола и 10%-ный раствор лизола убивают возбудителя только через 24 ч, а 4%-ный формалин — через 3 ч.

В качестве дезинфицирующих растворов при туберкулезе наиболее эффективны следующие: 3%-ный щелочной раствор формальдегида при 3-часовой экспозиции; растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция и взвеси, содержащие не менее 5% активного хлора при экспозиции 3 ч; 1%-ный раствор глутарового альдегида, 3–5%-ный раствор хлорамина В.

Патогенность. Бычий вид микобактерий вызывает болезнь у коров, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, оленей, маралов и др. Из лабораторных животных наиболее чувствительными к данному виду микобактерий являются кролики и морские свинки, у которых развивается генерализованная форма туберкулеза.

Птичий вид микобактерии вызывает туберкулез у кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов, голубей, уток и др. Из лабораторных животных наиболее подвержены данному заражению кролики, наименее восприимчивы — морские свинки.

Инкубационный период длится от нескольких недель до нескольких лет.

Лабораторная диагностика. Выделить культуру возбудителя туберкулеза в чистом виде трудно, здесь успех во многом зависит от качества исследуемого материала. В каждом случае перед посевом применяют соответствующий метод обработки материала. Для освобождения от посторонней микрофлоры исследуемый материал (молоко, мочу, слизь, пораженные органы и ткани) заливают 6–10%-ным раствором серной кислоты (метод Гона) на 25–30 мин.

Для дифференциации микобактерий существуют следующие основные методы: микроскопический, культуральный, биологический, биохимический и серологический. Существует также ряд других методов, но они менее распространенные.

Микроскопический метод. Морфологически бычий вид микобактерий туберкулеза более грубый, палочки достигают длины 1,5–4,5 и толщины 0,3–0,5 мкм; человеческий вид микобактерий более длинный, тонкий и стройный; микобактерии птичьего вида могут быть как в виде коротких, так и длинных полиморфных палочек. Необходимо знать, что размеры и форма всех туберкулезных микобактерий относительно и при определенных условиях они колеблются иногда в довольно широких пределах.

Культуральный метод. Вирулентные культуры разных видов микобактерий имеют различную скорость роста и различные культуральные свойства на плотных и жидких питательных средах.

Сущность *биологического метода* дифференциации заключается в определении патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые отличаются восприимчивостью к различным микобактериям туберкулеза.

Параллельное заражение двух морских свинок такими же дозами культуры микобактерий позволяет дифференцировать возбудителя птичьего вида, к которому они нечувствительны,

в то время как микобактерии человеческого и бычьего видов вызывают у них прогрессивные туберкулезные изменения.

Биохимический метод основан на проявлении различной ферментативной активности микобактерий разных видов.

Серодиагностику применяют при ранней стадии определения туберкулеза. Для выявления антигенного родства между истинными и атипичными микобактериями используют реакцию связывания комплемента (РСК) и реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА), а также реакцию кольце-преципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РДП в геле).

Аллергическая диагностика туберкулеза. В настоящее время основным прижизненным методом исследования животных на туберкулез служит внутрикожная туберкулиновая проба — туберкулинизация. Туберкулин для млекопитающих изготавливают из штаммов только бычьего вида.

Анализируют реакцию через 72 ч по результатам измерения толщины кожной складки с учетом характера образовавшейся припухлости. У больных животных кожная складка увеличивается на 3 мм и более.

Иммунитет и средства специфической профилактики. При туберкулезе иммунитет становится нестерильным и остается таким до тех пор, пока в организме присутствуют живые микобактерии туберкулеза.

В 1924 г. французские ученые А. Кальметт и К. Герен предложили вакцину против туберкулеза. В ветеринарной практике вакцину БЦЖ применяют в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах в соответствии с наставлением, утвержденным в 1985 г.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Паратуберкулез или паратуберкулезный энтерит — хроническая болезнь крупного рогатого скота (реже овец), характеризующаяся сначала периодическим, затем постоянным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта. Большое животное погибает от прогрессирующего истощения.

Паратуберкулез в нашей стране был установлен в 1927 г. К. Г. Бодем, инфекция была занесена в бывший СССР с импортным племенным скотом.

Морфология. Возбудитель *Mycobacterium paratuberculosis* (бактерия Johnе, названа по имени автора, открывшего микроб в 1895 г.) — самый мелкий из всей кислотоустойчивой группы микробов. Его длина 0,5–1,5 мкм, ширина 0,2–0,5 мкм, окрашивается по Циль–Нильсену и Граму. В патологическом материале (комки слизи, пораженные части слизистой кишечника) бактерии характерно располагаются в виде кучек или группами по 2–4 клетки.

Культивирование. Получение первичных культур микобактерий паратуберкулеза связано со значительными трудностями. Решающим моментом при их выращивании является введение в питательную среду вытяжки из убитых туберкулезных или других кислотоустойчивых бактерий (например, *Myc. phlei*, выделенной из тимофеевой травы). В обычных питательных средах микроб не в состоянии ассимилировать необходимые для своего роста вещества, которые имеются в упомянутых экстрактах. Была предложена некая благоприятная среда из следующих ингредиентов: бактериальная масса микобактерий тимофеевой травы, печеночный экстракт, глицерин, свежее яйцо и спиртовой раствор краски генцианвиолет.

Для роста культур благоприятна температура 38°C. Первые признаки роста с момента посева появляются через 6 недель. На плотных средах (яичные среды Петраньяни, Гельберта, Левенштейна, агаризированная среда Сотона) вначале вырастают изолированные желто-белые мелкие колонии, которые в дальнейшем приобретают вид сосочков.

На жидких средах (Данкина, Вишневского, Дорсета, Бокэ) образуется нежная беловато-серая пленка, которая через 3–4 мес. культивирования увеличивается в объеме и оседает на дно колбы или пробирки.

Устойчивость. Возбудитель паратуберкулеза довольно устойчив к воздействию физико-химических и биологических факторов. В почве и навозе он сохраняется до 10–12 мес., в кормах и воде непроточных водоемов — 8–10 мес., в моче — 7 сут. Солнечный свет убивает его через 10 мес. В молоке, в закрытых сосудах, при нагревании до 63°C гибнет через 30 мин, при 65°C — через 25, а при 85°C — уже в течение 1–5 мин.

Из дезинфектантов рекомендуют использовать 10% -ные и 20% -ные растворы хлорной извести, 5% -ные растворы формалина, лизола, феносмолина, фенолятов натрия.

Антибиотики, синтетические противотуберкулезные соединения, противомикробные препараты, сульфаниламиды лишь частично угнетают рост микобактерий паратуберкулеза.

Патогенность. Микобактерии паратуберкулеза поражают крупный рогатый скот (особенно молодняк), буйволов, верблюдов, овец и коз. Лошади, мулы и свиньи паратуберкулезом не болеют.

В качестве лабораторных животных служат кролики, хомяки, мыши. Инкубационный период весьма продолжительный — от нескольких месяцев до двух лет и более. Паратуберкулез представляет собой алиментарную инфекцию. Поскольку возбудитель выделяется с калом больных животных, заражение происходит через инфицированные корма, воду, подстилку, пастбище.

Лабораторная диагностика. Бактериологический диагноз является решающим, особенно в доклиническом периоде болезни. Его устанавливают в основном микроскопией испражнений больного животного. Из фекалий собирают комочки слизи или кровяные сгустки, распределяют их тонким слоем на предметном стекле и после фиксации на пламени окрашивают по Цилю–Нильсену. При отрицательном результате необходимы повторные исследования через различные промежутки времени.

Для посмертной диагностики паратуберкулеза от павшего или убитого животного в лабораторию направляют отдельные участки пораженного кишечника и увеличенные брыжеечные лимфатические узлы, консервированные в стерильном 30% -ном растворе глицерина. Кал пересылают в стерильной закрытой посуде (пробирках, флакончиках).

Биопроба на лабораторных животных микобактериями ясных результатов не дает, поэтому ее практически не используют.

При паратуберкулезе, особенно в период его клинического проявления, в сыворотке крови животных при помощи серодиагностики (РСК) можно обнаружить комплементсвязывающие антитела. Основной недостаток РСК — отрицательные результаты в большинстве случаев в доклинический период, а также неспецифические реакции у животных, больных туберкулезом, возбудители которого по антигенной структуре близки к бактерии Йоне.

Аллергическая диагностика. Паратуберкулезный скот реагирует на альттуберкулин для птиц в 80% и на паратуберкулин

(ионин) в 94% случаев. Положительной реакцией считают появление на месте введения аллергена разлитого отека без строгой конфигурации и границ, размерами приблизительно 35×45 на 100×120 мм и более, напряженного в центре и тестоватой консистенции по краям, горячего на ощупь и болезненного при пальпации.

Доза альттуберкулина зависит от возраста животного: до двух лет вводят 0,2 мл; от двух до трех лет — 0,3; старше трех лет — 0,4 мл.

Иммунитет и специфическая профилактика. Природа иммунитета паратуберкулеза в значительной степени остается невыясненной. Эффективность предлагаемых вакцин и необходимость их применения в целях борьбы с паратуберкулезом также остаются неясными.

Радикальных средств лечения больных паратуберкулезом нет. Лучшим средством для борьбы остается убой клинически больных и положительно реагирующих животных с последующим выполнением комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на обезвреживание объектов, контактированных возбудителем паратуберкулеза.

2.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ АКТИНОМИКОЗА

Актиномицеты (от *греч.* *actis* — луч, *mykos* — гриб) представляют собой одноклеточные микроорганизмы, сходные по строению как с грибами, так и с бактериями. Актиномицеты широко распространены в природе, встречаются в почве, на поверхности растений. Многие из них вырабатывают антибиотические вещества, способные подавлять жизнедеятельность других микроорганизмов. Эта способность используется в производстве антибиотических препаратов.

В патологии человека имеет значение *Act. israeli*, выделенный в 1891 г. И. Израэлом от больных актиномикозом людей. К патогенным актиномицетам, вызывающим истинный актиномикоз у животных, относят *Act. bovis*, открытый в 1877 г. К. Гарцем. Возбудитель включен в секцию 15, род *Actinomyces*.

Актиномикоз (*Actinomycosis*) — хроническая болезнь домашних и некоторых видов диких животных, характеризую-

щаяся образованием соединительнотканых плотных узлов, гранулем, абсцессов и других поражений в различных органах и тканях.

Морфология. В пораженных тканях, гное *Act. bovis* обнаруживают в виде зерен, напоминающих крупинки песка. Эти структуры получили название «друзы». Они состоят из нитей актиномицетов, которые расходятся от центра в радиальном направлении в виде лучей, концы которых колбовидно или булавовидно утолщены. Величина друз колеблется от 20–40 до 150–320 мкм, в среднем она достигает 60–80 мкм.

На плотных питательных средах *Act. bovis* образует хорошо развитый несептированный одноклеточный мицелий в виде ветвящихся тонких нитей, достигающих 100–600 мкм в длину и 0,5–1,2 мкм в поперечном сечении. Актиномицеты грамположительные, хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красителями. В молодых культурах мицелий однороден, в старых начинают появляться вакуоли, оболочка становится хрупкой, легко ломается, что приводит к образованию палочковидных форм.

В жидких культурах актиномицеты растут в виде зернышек или крупинок, состоящих из густого сплетения мицелиальных нитей, хорошо окрашивающихся по Граму.

Культивирование. *Act. bovis* культивируют в анаэробных условиях при оптимальной температуре 37°C на агаре Сабуро, а также глюкозо-кровяном агаре при pH 4,4–9,0. Растут медленно, на 15–30-е сут. после посева обнаруживаются небольшие белые или желтоватые колонии в толще агара, которые могут быть гладкими или шероховатыми, напоминающими по виду цветную капусту, пушистыми или мучнистыми, бесцветными или пигментированными. Колонии вырастают в агар и с трудом снимаются с питательных сред.

При пересевах на МПА, МПЖ, на свернутую сыворотку крови крупного рогатого скота развиваются колонии аэробных актиномицетов, характерной особенностью которых является образование воздушного мицелия, на концах которого формируются споры, придающие поверхности колонии мучнистый вид.

В жидких средах — МПБ, молоке, сахарном бульоне, среде Чапека — актиномицеты растут в виде зернышек, пушинок или морщинистых пленок.

Биохимические свойства. *Act. bovis* ферментирует с образованием кислоты глюкозу, левулезу, галактозу, глицерин, разжижает желатин, разлагает белок с образованием сероводорода, свертывает молоко с последующей пептонизацией. В отличие от *Act. israeli*, он чувствителен к стрептомицину и нечувствителен к хлорамфениколу, гидролизует крахмал, на кровяном агаре с 1% глюкозы в анаэробных условиях дает слабый гемолиз.

Устойчивость. Актиномицеты весьма устойчивы к действию физико-химических факторов. Особенно резистентны их споры. Нагревание до 70–80°C убивает их в течение 5 мин, под воздействием солнечных лучей они гибнут через 3 ч, лучей ртутно-кварцевой лампы — через 30 мин. Низкая температура консервирует актиномицеты на 1–2 года, высушивание при комнатной температуре не убивает их до шести лет. Сулема (1:1000) убивает через 5–10 мин, 3% -ный раствор формалина — за 5–7 мин, 5% -ный раствор хлорамина — за 3 ч, 5% -ный раствор лизола — за 30 мин. Лучший дезинфектант — щелочной раствор 3% -ного формальдегида.

Патогенность. *Act. bovis* вызывает болезнь у домашних, диких и лабораторных животных. У крупного рогатого скота актиномикозные поражения бывают на языке, коже головы, верхней части шеи, межчелюстного пространства, в костях челюсти, иногда на семенниках.

У свиней поражаются часть миндалин, вымя, реже челюстные кости и язык. У овец и коз локализация процесса и симптомы болезни такие же, как и у крупного рогатого скота. Известны случаи поражения легких. У лошадей актиномикозы могут быть в семенных канатиках, особенно после кастрации.

Актиномикозам может быть подвержен и человек. Болезнь сопровождается образованием инфильтратов, гнойных очагов, содержащих зерна или нити актиномицетов (так называемые друзы), свищей, вскрывающихся наружу или внутрь организма. Как у животных, так и у людей встречается генерализованный актиномикоз.

Лабораторная диагностика сводится к микроскопическому исследованию содержимого актиномикозных очагов, гноя, экссудата, в которых обнаруживаются друзы, состоящие из нитей актиномицетов. Исследуют как неокрашенные, так и окрашенные препараты.

Иммерсионный объектив используют главным образом для просмотра препаратов, окрашенных по Граму. Этот же метод используют для окраски препаратов, приготовленных из культур *Act. bovis*, которые получают путем посева патологического материала на агар Сабуро или другие питательные среды. Наличие в препаратах мицелия и спор является достаточным основанием при установлении лабораторного диагноза на актиномикоз.

Иммунитет. Природа иммунитета при актиномикозе изучена недостаточно. Считается, что после переболевания животные заражаются повторно, хотя в сыворотках крови переболевших установлены агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие антитела. В качестве антигена используют фильтрат лиxivированных бульонных культур актиномицетов.

Лечение. Лучшим средством для лечения актиномикоза животных считают йодистые препараты (йодистый калий или йодистый натрий), которые инъецируют в пораженные участки, вводят внутрь (*per os*) или внутривенно. Применяют пенициллин, стрептомицин.

Не рекомендуется проводить выпас больных животных на заболоченных пастбищах, а также скармливать им грубые корма.

2.4. ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* (Koch, 1872) — типичный представитель патогенных бацилл. Относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Этот микроб часто называют бациллой антракса.

Сибирская язва (*Anthrax*) — высококонтагиозное опасное заболевание человека и животных, относится к зооантропонозным. Восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, а также человек. Инфекционный процесс протекает преимущественно остро, с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Название болезни — «сибирская язва» — предложил в 1789 г. С. С. Андриевский, который изучал ее на Урале и в Сибири.

Морфология. Бациллы антракса довольно крупные (1–1,3×4,0–10,0 мкм) палочки, неподвижные, грамположительные;

образуют капсулу и споры. Микроб встречается в двух формах: вегетативной, в виде палочек различной величины, и споровой.

В препаратах, приготовленных из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных, микробы располагаются попарно или в виде коротких цепочек (3–4 клетки, окруженные капсулой). Концы палочек в цепочках прямые, с резко обрубленными концами, а свободные — слегка закругленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из чистой культуры сибиреязвенные палочки располагаются длинными цепочками.

В организме или при культивировании на искусственных питательных средах с добавлением сыворотки крови сибиреязвенная бацилла образует капсулу, а также в живом организме или невскрытом трупe.

Сибиреязвенная бацилла во внешней среде при неблагоприятных условиях существования формирует споры. В каждой вегетативной клетке образуется только одна овальная эндоспора, чаще располагающаяся центрально.

Культивирование. Сибиреязвенный микроб по способу дыхания относят к факультативным анаэробам. Бацилла антракса нетребовательна к условиям питания и хорошо растет на универсальных средах. Оптимальная температура роста культуры 35–37°C; оптимум рН среды — 7,2–7,6; споры образуются при 12–45°C. Диаметр спор никогда не превышает ширины клетки. Попав в благоприятные условия, споры прорастают и из них формируются вегетативные клетки, способные размножаться.

На МПА образует колонии R-формы диаметром 3–5 мм с неровными краями и шероховатой поверхностью.

В МПБ сибиреязвенная бацилла через 16–24 ч на дне пробирки образует хлопьевидный осадок, сам бульон остается прозрачным.

Весьма характерный рост отмечают в столбике желатина при посеве уколом. После укола на 2–5-е сутки появляется серовато-белый стержень, от которого под прямым углом радиально отходят нежные боковые отростки, более длинные по мере приближения к поверхности среды и постепенно укорачивающиеся по направлению вниз. Такая культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой

желатина начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка.

В молоке *B. anthracis* размножается быстро, вырабатывает кислоту, на 2–4-е сутки оно свертывается с последующей пептонизацией сгустка. На картофеле образует сухой серо-белый налет, иногда с кремовым оттенком.

Биохимические свойства. Возбудитель *B. anthracis* вырабатывает желатиназу, на 2–4-й день свертывает молоко с постепенной пептонизацией сгустка, на кровяном агаре не вызывает гемолиз. *B. anthracis* ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, левулозу и декстрин; синтезирует лецитиназу и медленно коагулирует растворы желтка куриного яйца; утилизирует цитраты, образует ацеталметилкарбинол и вследствие этого дает положительную реакцию Фогеса — Проскауэра; редуцирует метиленовый синий и восстанавливает нитраты в нитриты.

Вырабатывает протеазу и достаточно быстро гидролизует желатин и свернутую сыворотку. Некоторые штаммы образуют сероводород, выделяют аммиак.

Токсинообразование. Бацилла антракса образует сложный экзотоксин, включающий в себя три компонента (фактора): эдематогенный фактор (EF), протективный антиген (РА) и летальный фактор (LF) или соответственно факторы I, II, III. Протективный антиген — носитель защитных свойств, обладает выраженным иммуногенным действием и в чистом виде нетоксичен. Летальный фактор сам по себе нетоксичен, но в смеси со II фактором (РА) вызывает гибель белых крыс, мышей и морских свинок. Все три компонента токсина составляют синергическую смесь, каждый из них обладает выраженной антигенной активностью и серологически активен.

Устойчивость и длительность выживания у вегетативных клеток и спор возбудителя сибирской язвы различны. Вегетативные формы относительно лабильны, а споры обладают высокой резистентностью.

В нескрытом трупe вегетативная форма микроба в результате воздействия протеолитических ферментов разрушается уже в течение 2–3 сут., в зарытых трупах сохраняется до 4 сут., через 7 сут. завершается лизис бактерий даже в костном мозге. В желудочном соке при 38°C гибнет через 30 мин, в замороженном

мясе при -15°C сохраняет жизнеспособность две недели, в засоленном мясе — до 1,5 мес. Навозная жижа, смешанная с сибирезвенной кровью, губительно действует на вегетативные клетки уже через 2–3 ч, однако споры остаются в ней вирулентными в течение многих месяцев, даже лет. Споры в запаянных ампулах сохраняют жизнеспособность и вирулентность до 63 лет, а в почве — более 60 лет.

К воздействию различных химических веществ вегетативные клетки малоустойчивы. Спирт, эфир, 2% -ный формалин, 5% -ный фенол, 5–10% -ный хлорамин, свежий 5% -ный раствор хлорной извести, пероксид водорода их разрушают в течение 5 мин.

Для уничтожения споровой формы возбудителя необходима более длительная экспозиция. Этиловый спирт в концентрациях от 25% до абсолютного разрушает споры в течение 50 сут. и более; 5% -ный фенол и 5–10% -ный раствор хлорамина — через несколько часов и даже суток; 2% -ный раствор формалина — через 10–15 мин; 3% -ный раствор пероксида водорода — через 1 ч; 10% -ный раствор гидроксида натрия — через 2 ч.

На споры высушивание не оказывает губительного действия. Сухой жар при $120\text{--}140^{\circ}\text{C}$ убивает споры только через 2–3 ч, при 150°C — через 1 ч.

Вегетативные клетки малоустойчивы к высоким температурам. При нагревании до $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$ гибнут в течение 1 ч; при 60°C — через 15 мин; при 75°C — через 1 мин; при кипячении — мгновенно. К низким температурам бактерии малочувствительны: при -10°C сохраняются 24 сут., при -24°C до 12 сут. Воздействие прямого солнечного света обезвреживает бактерии через несколько часов.

Возбудитель сибирской язвы проявляет высокую чувствительность к пенициллину, хлортетрациклину и левомицетину, а также к литическому действию лизоцима.

Патогенность. К возбудителю сибирской язвы восприимчивы все виды млекопитающих. В естественных условиях чаще болеют овцы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, реже — ослы и мулы. Чрезвычайно восприимчивы козы, буйволы, верблюды и северные олени. Сибирская язва у свиней протекает, как правило, хронически, с длительным бациллоносительством. Среди диких животных восприимчивы все травоядные. Извест-

ны случаи заболевания собак, волков, лисиц, песцов, среди птиц — уток и страусов.

Возбудитель сибирской язвы может выделяться из организма с бронхиальной слизью, слюной, молоком, мочой и испражнениями.

Лабораторная диагностика. При подозрении на сибирскую язву трупы павших животных запрещается вскрывать. Для лабораторного исследования чаще всего направляют ухо павшего животного или толстые нефиксированные мазки крови из надреза кровеносного сосуда на предметном стекле. При вынужденном убое или подозрении на сибирскую язву во время вскрытия осторожно отбирают кусочки селезенки, печени, измененные лимфоузлы, от трупов свиней — кусочки отечных тканей в области глотки и заглочные лимфоузлы. Материал должен быть свежим, так как в разложившихся тканях бацилла антракса подвергается лизису. Направляют также пробы почвы, фуража, воды, шерсти и кожевенно-мехового сырья; объектами для серологического исследования в реакции преципитации служат пробы кожевенно-мехового сырья и разложившиеся ткани.

Исследование проводят по обычной следующей схеме: микроскопия мазков, выделение и изучение биологических свойств чистой культуры возбудителя, биопроба на лабораторных животных, при необходимости серологические исследования — РП и иммунофлюоресцентный анализ.

Микроскопия. Из патологического материала готовят мазки, часть которых красят по Граму и обязательно на наличие капсулы — по Михину, Ребигеру, Ольту и др. Важным диагностическим признаком является обнаружение в препарате коротких цепочек из палочек с обрубленными концами, окруженных общей капсулой.

Посев на питательные среды. Исходный материал засевают в МПБ и на МПА, посевы инкубируют при 37°C в течение 18–24 ч; при отсутствии роста выдерживают в термостате еще 2 сут. Культуры просматривают, определяют их типичность, готовят препараты, микроскопируют. В мазках из суточной культуры обнаруживают вегетативные (бескапсульные) палочки, расположенные длинными цепочками, которые на 2–3 сут., по мере старения превращаются в споры.

Биологическая проба. Заражают белых мышей, морских свинок, кроликов одновременно с посевом материала на питательные среды. Белым мышам вводят подкожно в области спины (по 0,1–0,2 мл), морским свинкам и кроликам — под кожу в область живота (по 0,5–1,0 мл). Мыши погибают через 1–2 сут., морские свинки и кролики — через 2–4 сут. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови, сердца, селезенки, печени и инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Идентификация бациллы антракса. В природе существуют несколько видов аэробных споровых сибиреязвенноподобных сапрофитов: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. subtilis*. Идентификацию и дифференциацию культуры проводят на основании главных и дополнительных признаков. К главным относят патогенность, капсулообразование, определение подвижности, тест «жемчужного ожерелья», пробу со специфическим фагом, иммунофлюоресцентный тест; к дополнительным — тесты на отсутствие гемолиза и лицетиназной активности, образование фосфатазы.

Бацилла антракса патогенна для лабораторных животных. Сибиреязвенноподобные сапрофиты не вызывают их гибель, за исключением *B. cereus*, которая убивает белых мышей при внутрибрюшинном заражении. Массивную с четкими контурами капсулу в организме образует только истинный возбудитель сибирской язвы.

Тест «жемчужного ожерелья», предложенный в 1953 г. Дж. Йенсенем, основан на способности пенициллина подавлять синтез клеточной стенки бацилл антракса, которые в результате этого образуют сферопласты. Методика заключается в том, что выделенную трехчасовую бульонную культуру высевают в две чашки Петри с МПА, содержащим убывающую концентрацию пенициллина. Агара в первой чашке содержится — 0,5, во второй — 0,05 ЕД пенициллина в 1 мл среды, третья — контрольная. Посевы инкубируют 3 ч при 37°C. В препаратах, приготовленных из выросших колоний, видны раздувшиеся шарообразные бактерии, расположенные в виде цепочек, напоминающих ожерелье.

Сибиреязвенноподобные сапрофиты на агаре с пенициллином этого феномена не образуют.

Проба с бактериофагом (лизабельность фагом). Сибиреязвенный фаг, взаимодействуя с гомологичной культурой, вызывает ее лизис. Эту высокоспецифичную реакцию применяют для идентификации бациллы антракса, а также дифференциации ее от ложносибиреязвенных бацилл. В качестве диагностикума в России выпускают фаг ВНИИВВиМ, гамма-фаг МВА.

Иммунофлуоресцентный тест. Идентификация возбудителя сибирской язвы при помощи флуоресцирующих антител относится к ориентировочному методу, который требует дополнительного изучения вирулентности, капсулообразования и фагочувствительности.

Серологическое исследование. Для обнаружения сибиреязвенных антигенов применяют реакцию преципитации по Асколи. Ее используют также для исследования на сибирскую язву кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала, в котором происходит лизис бациллы антракса, а также для исследования свежего патологического материала и серологической идентификации выделенных культур. РП по Асколи — достоверный и широко применяемый в практике тест серологической диагностики сибирской язвы.

Молекулярные методы. Фирма «Нарвак» выпускает тест-систему для идентификации возбудителя, имеющего ген капсулообразования (сар В), в ПЦР. Чувствительность метода — $1 \cdot 10^3$ мк/г ткани.

Для выявления свежих случаев и ретроспективной диагностики сибирской язвы у животных предложен аллерген ВНИИВВиМ.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевание животного сибирской язвой или же его вакцинация сопровождаются развитием гиперчувствительности замедленного типа. В результате естественного заражения и переболевания сибирской язвой у животных возникает длительный иммунитет.

Активная защита животных от сибирской язвы путем вакцинации — надежное средство профилактики данного заболевания. С этой целью применяют живые споровые сибиреязвенные вакцины.

Новую вакцину против сибирской язвы из бескапсульного авирулентного штамма 55 выпускают в жидком и лиофилизированном виде. Вакцину вводят животным, начиная с 3-месячного

возраста однократно подкожно. Иммуитет наступает через 10 сут. и сохраняется около 1 года.

В практике используют также живую вакцину ВГНКИ, ассоциированную живую вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота.

Убой на мясо животных, привитых против сибирской язвы живой вакциной, разрешается не ранее чем через 14 сут.

Для лечения и пассивной профилактики применяют антибиотики, противосибиреязвенную гипериммунную сыворотку и гамма-глобулин. Пассивный иммунитет наступает уже через несколько часов и сохраняется до 14 дней.

При установлении сибирской язвы на мясоперерабатывающем предприятии проводят комплекс мероприятий, предупреждающих возможность заражения людей и животных, а также распространение инфекции. При возникшем подозрении на сибирскую язву дальнейший убой животных прекращают. От подозрительной туши берут часть селезенки, пораженные лимфатические узлы для микробиологического исследования, до получения результатов тушу и все органы изолируют.

При микроскопическом подтверждении диагноза на сибирскую язву тушу со всеми органами и шкурой сжигают, не дожидаясь результатов бактериологического исследования. Все продукты, полученные от убоя других животных, смешанные с продуктами убоя от больных сибирской язвой, сжигают также.

После удаления продуктов убоя скота и разделки туш проводят дезинфекцию. В целях предупреждения возникновения сибирской язвы рабочим вводят лечебную противосибиреязвенную гипериммунную сыворотку.

2.5. ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ

ВОЗБУДИТЕЛЬ БОТУЛИЗМА

Возбудитель ботулизма *Clostridium. botulinum* (от лат. *botulus* — колбаса) вызывает остропротекающий кормовой и пищевой токсикоз. Возбудитель — строгий анаэроб, который размножается и выделяет сильнейший экзотоксин в колбасе, ветчине, грибах домашнего консервирования. Болезнь

развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Ботулизм описан в середине XVIII в., его название связано с появлением болезни у людей в результате употребления в пищу кровяной колбасы. Возбудитель же был открыт в 1896 г. Ван Эрменгемом, который выделил его из зараженной ветчины, а также селезенки человека, погибшего от ботулизма.

При консервировании продуктов, загрязненных спорами ботулизма, при нарушении технологического процесса стерилизации споры прорастают и начинают продуцировать экзотоксин. Дальнейшее изучение показало, что в природе существует семь сероваров *Cl. botulinum* (А, В, С, D, Е, F и G), которые различаются между собой по антигенной структуре экзотоксинов.

Морфология. *Cl. botulinum* в окрашенных препаратах имеет вид крупных палочек с закругленными концами длиной 4–9 и шириной 0,6–0,8 мкм. Бактерии располагаются изолированно или парами, иногда в виде коротких цепочек. Микроб образует капсулу, подвижен (перитрих), споры чаще располагаются субтерминально, поэтому палочки со спорами имеют вид теннисных ракеток.

Культивирование. Возбудители ботулизма — строгие анаэробы. Для культивирования применяют специальные среды: глюкозо-крово́яной агар Цейсслера, печеночный агар с глюкозой, агар столбиком с глюкозой, среду Китта — Тароцци, бульон Хоттингера под вазелиновым маслом с кусочками печени и 0,5–1,0% глюкозы.

Оптимальная температура для роста и токсинообразования бактерий сероваров А, В, С, D составляет 35°C, для сероваров Е и F — 28–30°C. Споры возбудителей ботулизма сероваров Е и F могут прорасти, размножиться и образовывать токсин даже при 4°C, развитие и токсинообразование сероваров А и В возможно при 10–55°C. Оптимум рН для них — 7,4–7,7.

Среда Китта — Тароцци мутнеет, со временем появляется осадок, и бульон становится прозрачным, культура издает запах прогорклого масла.

На агаре Цейсслера вырастают мелкие прозрачные колонии с ровными или изрезанными краями, окруженные зоной

гемолиза. Колонии одного штамма неоднородны и могут быть нескольких типов. В глубине сахарного агара образуют колонии в виде чечевицы или комочков ваты с уплотненным центром.

Биохимические свойства. *Cl. botulinum* среды с сахарами ферментирует с образованием газа и кислоты глюкозу, левулезу, мальтозу, глицерин, декстрин, салицин, адонит, инозит и не разлагает галактозу, сахарозу, дульцит, маннит, арабинозу и рамнозу. Однако эти свойства непостоянны и не могут служить критерием идентификации микроба и дифференциации его сероваров.

Токсинообразование. В анаэробных условиях в организме животных, субстратах растительного и животного происхождения, а также на специальных питательных средах *Cl. botulinum* синтезирует чрезвычайно сильный экзотоксин, относящийся к группе нейротоксинов. Самый сильный токсин вырабатывает серовар А.

Каждый из семи сероваров возбудителя ботулизма образует токсин, имеющий только ему присущую антигенную структуру. В составе токсина различают не менее пяти факторов: нейротоксин, гемолизин, гемолизин-гемагглютинин, липазу и протеазу. Токсическими факторами *Cl. botulinum* также служат ферменты патогенности и среди них протеиназы, лецитиназы и декарбоксилазы.

Устойчивость. Вегетативные клетки возбудителя малоустойчивы к воздействию различных факторов внешней среды. Температура 80°C убивает их через 30 мин, кипячение — через 2–5 мин.

Резистентность спор очень высокая. В высушенном состоянии они сохраняют жизнеспособность десятилетиями. К нагреванию споры более устойчивы в среде, содержащей значительное количество жира, наличие ионов железа, кальция, высокая концентрация сахарозы также повышают термостойкость.

Споры клостридий ботулизма сероваров А, В и F наиболее устойчивы к кипячению, а споры сероваров А и В хорошо переносят кипячение (100°C) в течение 5 ч и погибают только через 6 ч. Поэтому более надежный способ обезвреживания спор возбудителя ботулизма — автоклавирование в течение не менее

30 мин при 120°C. Споры хорошо переносят низкие температуры и не погибают при -19°C; при -16°C сохраняются до 1 года, но часть их при этом разрушается. Желудочный сок и пищеварительные ферменты их не разрушают.

Споры также устойчивы и к различным химическим бактерицидным веществам. В 5% -ном феноле сохраняют жизнеспособность 1 сут.; 10% -ный раствор соляной кислоты убивает их при комнатной температуре через 1 ч; 40% -ный формалин в двукратном разведении — через 24 ч; этиловый спирт — через 2 мес. В среде, содержащей 14% поваренной соли, они выживают 2 мес.

Ботулинический экзотоксин в жидких средах разрушается при кипячении через 15–20 мин, в твердых субстратах — через 2 ч. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин) не разрушают токсины сероваров А, В, С, D, F, но усиливают активность токсина серовара Е. В кислой среде при рН 3,5–6,8 устойчивость токсинов выше, чем в щелочной; при рН 7,8 они значительно снижают свои токсические свойства; рН выше 8,5 их инактивирует.

Патогенность. Наиболее чувствительны к ботулиническому токсину лошади, у них болезнь чаще вызывают токсины серовара В, реже — сероваров А и С. Крупный рогатый скот, а также коз и овец поражает токсин сероваров С и D. Свиньи в естественных условиях проявляют к ботулизму значительную устойчивость, *однако экспериментально заболевание можно вызвать всеми сероварами токсина.* Собаки, кошки, волки и другие хищники более резистентны. Исключение составляют норки, которые проявляют высокую чувствительность к ботулизму и поражаются чаще всего токсином серовара С. Описан ботулизм песцов, черно-бурых лисиц и ондатр. К ботулизму восприимчивы более 36 видов птиц.

Чувствителен к ботулизму и человек; в качестве этиологических факторов выделены клостридии сероваров А, В и Е.

Лабораторные животные (белые мыши, морские свинки и кролики) восприимчивы к ботулиническим токсинам всех сероваров.

Лабораторная диагностика. Биологическое исследование направлено на обнаружение ботулинических токсинов различных сероваров. Пробы патологического материала растирают

с физиологическим раствором, затем для экстрагирования выдерживают при комнатной температуре 1–2 ч, пропускают через ватно-марлевый фильтр. Цитратную кровь и сыворотку не разводят, но исследуют сразу после взятия, так как токсин в них разрушается очень быстро.

Для постановки биопробы берут четырех белых мышей массой по 16–18 г каждая. Двум из них исследуемый материал (0,5–0,8 мл) вводят внутрибрюшинно или внутривенно (в хвостовую вену). Две другие остаются контрольными, им вводят предварительно прогретый в течение 30 мин при 100°C экстракт. При наличии ботулинического токсина две первые мыши гибнут через 1–4 сут., контрольные остаются живы.

Типизацию токсина проводят в реакции нейтрализации с гомологичными антитоксическими сыворотками согласно прилагаемому к ним наставлению.

Выпускается диагностический набор для обнаружения в кормах при помощи ПЦР (фирма «Биоконтроль»).

Иммунитет и средства специфической профилактики. При ботулизме иммунитет антитоксический. У восприимчивых животных естественный иммунитет к ботулизму отсутствует, перенесенное заболевание также не формирует иммунитет.

Для специфической профилактики ботулизма используют анатоксины, преципитированные квасцами или сорбированные на гидроксиде алюминия. Из животных вакцинируют только норок. Они очень чувствительны к токсину серовара С и при поедании недоброкачественных кормов заболевают ботулизмом. Для лечебных целей выпускают антитоксическую сыворотку.

ВОЗБУДИТЕЛЬ СТОЛБНЯКА

Возбудитель столбняка *Clostridium tetani* вызывает остро протекающую неконтагиозную раневую инфекцию, при которой нервная система животного поражается экзотоксином микроба.

Болезнь возникает в результате различных травм и ранений при условии внесения в них спор возбудителя, что возможно при попадании почвы, содержащей споры возбудителя, и сопровождается тоническими и клоническими судорогами мышц.

Возбудитель столбняка был открыт Н. Д. Монастырским в 1883 г. и А. Николайером в 1884 г., чистая культура была выделена в 1889 г. С. Китазато.

Морфология. *Cl. tetani* — тонкая палочка длиной 3–12 и шириной 0,3–0,8 мкм. Столбнячная палочка капсулу не образует, подвижна (перитрих), имеет до 20-ти и более жгутиков. Споры формируются в культурах обычно на 2–3 сут., они также образуются и в организме. Споры в 2–3 раза шире клетки, располагаются терминально, в результате этого бактерия приобретает вид барабанной палочки.

Культивирование. Возбудитель столбняка — строгий анаэроб. На поверхности плотных питательных сред растет только в условиях анаэробноза при остаточном давлении не выше 0,7 кПа. Оптимальные условия: pH — 7,4–7,6 и температура — 36–38°C.

В среде Китта — Тароцци обычно через 24–36 ч появляется равномерное помутнение с незначительным газообразованием, на 5–7-е сутки выпадает рыхлый осадок, среда при этом становится прозрачной. Культура столбняка издает своеобразный запах жженого рога.

На глюкозо-кровоном агаре в анаэробных условиях образует нежные беловато-серые колонии с отростками и приподнятым центром, иногда в виде мелких круглых, напоминающих капельки росы. Колонии окружены слабой зоной гемолиза (2–4 мм). В глубине агара через 1–2 сут. вырастают плотные колонии, напоминающие чечевичное зерно. В столбике желатина на 5–12 сут. появляется рост в виде елочки и медленное разжижение субстрата. Молоко свертывается на 5–7-е сутки с образованием мелких сгустков казеина, мозговая среда чернеет при продолжительном культивировании.

Биохимические свойства. В отличие от других патогенных клостридий он характеризуется слабой биохимической активностью: не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты. Однако некоторые штаммы могут ферментировать глюкозу в зависимости от концентрации в среде ионов железа.

Cl. tetani обладает слабыми протеолитическими свойствами, вызывая медленную ферментацию протеинов и пептонов до аминокислот, которые затем разлагаются с образованием угольной кислоты, водорода, аммиака, летучих кислот и индола.

Токсинообразование. Возбудитель столбняка лишен факторов инвазивности, но обладает способностью синтезировать экзотоксин высокой активности. Столбнячный токсин получен и описан Э. Берингом и С. Китагато в 1890 г. Токсин обуславливает всю специфику патогенеза и клиническую картину столбняка.

Устойчивость. Vegetативные клетки *Cl. tetani* малоустойчивы к воздействию различных факторов внешней среды: погибают в течение 30 мин при 60–70°C, через 15–20 мин при воздействии обычных дезинфицирующих препаратов.

Споры, напротив, весьма резистентны. В почве, высохшем кале, на различных предметах, защищенных от света, они сохраняются в течение многих лет. Прямой солнечный свет инактивирует споры через 3–5 сут., при нагревании до 80°C сохраняют жизнеспособность 6 ч. При кипячении споры погибают через 30–50 мин, сухой жар (115°C) разрушает их только через 20 мин. Они также относительно устойчивы к различным дезинфектантам: 1% -ный раствор сулемы, 5% -ный раствор фенола убивают их через 8–10 ч; 1% -ный раствор формалина — за 6 ч; 0,5% -ный раствор соляной кислоты — за 30 мин; 10% -ная настойка йода — за 10 мин; 1% -ный раствор азотнокислого серебра — за 1 мин.

Патогенность. К столбняку восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных, но наиболее чувствительны лошади. Болеют также собаки, кошки и дикие млекопитающие. Описаны случаи столбняка у кур, гусей и индюков. К столбнячному токсину исключительно восприимчив человек.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, гной, выделения из ран.

При исследовании выделяют чистую культуру возбудителя столбняка и его токсин. Мазки окрашивают по Граму, наличие в препаратах грамположительных палочек с круглыми терминальными спорами, в виде барабанной палочки, дает основание подозревать столбняк.

Биопробу проводят для обнаружения токсина в патологическом материале и культуре. Исследуемый материал растирают в стерильной ступке с кварцевым песком, добавляют двойной объем физиологического раствора. Фильтрат вводят внутримышеч-

но в бедро задней лапки дозой 0,5–1,0 мл. Из лабораторных животных наиболее восприимчивы белые мыши, морские свинки и кролики. Погибающие животные принимают характерную позу с искривлением тела и вытянутыми лапками. Их гибель наступает в промежутке от 10–12 ч до 5 сут.

Столбнячный токсин в культурах может быть обнаружен и при помощи реакций нейтрализации (РН) и непрямой гемагглютинации (РНГА).

Иммунитет и средства специфической профилактики. У нас в стране применяют высокоэффективный концентрированный столбнячный анатоксин, представляющий собой преципитат 1%-ного квасцового анатоксина, изготовленный из нативного столбнячного экзотоксина путем обработки его формалином, теплом, алюмокалиевыми квасцами и фенолом. Иммунитет наступает через 30 сут. после прививки и сохраняется у лошадей в течение 3–5 лет, у других видов животных — не менее года.

Для пассивной иммунизации и лечения больных животных предложена антитоксическая противостолбнячная сыворотка гипериммунизированных столбнячным анатоксином лошадей.

КЛОСТРИДИИ ПЕРФРИНГЕНСА

Clostridium perfringens (*Cl. welchii*) был открыт и описан в 1982 г. Уэлчем и Нетталом. Вызывает инфекционную энтеротоксемию животных. Широко распространен в природе и встречается повсеместно, особенно большое количество его обнаруживают в почве, богатой гумусом. Основной резервуар сохранения возбудителя — здоровые люди и животные, в желудочно-кишечном тракте которых он размножается. *Cl. perfringens* выделяется с фекалиями во внешнюю среду, загрязняет почву, пастбища и корма, вначале вегетативными формами, а затем спорами, так как микроб быстро спорулирует и сохраняется длительное время. Таким образом, *Cl. perfringens* входит в состав нормальной микрофлоры кишечника, количество клостридий в 1 г содержимого кишечника доходит до 10^3 – 10^6 . Микроб отнесен к санитарно-показательным микроорганизмам, хотя наличие спор не позволяет этого делать, так как споры длительно сохраняются в объектах внешней среды.

Морфология. *Cl. perfringens* грамположительные, неподвижные, толстые палочки длиной 4–8 и шириной 0,6–1,5 мкм. Под воздействием различных факторов (антибиотики, неблагоприятный состав среды и др.) форма бактерий может изменяться, поэтому в культуре наряду с типичными клетками обнаруживают длинные с заостренными концами нити, достигающие 100–145 мкм. В организме животных образует капсулу, когда входит в ассоциацию возбудителей, вызывающих газовую гангрену или злокачественный отек. Спорообразование может происходить в почве, кишечнике и пищевых продуктах.

Культивирование. *Cl. perfringens* самый нетребовательный из анаэробов, очень активный в биохимическом отношении и весьма патогенный. На среде Китта — Тароцци уже через 2–3 ч после посева дает равномерное помутнение и газообразование. Через 3–5 дней среда просветляется и на дно выпадает белый осадок. Культура издает неприятный запах масляной кислоты. На поверхности плотных питательных сред образует колонии S- и R-формы. *Cl. perfringens* при росте на кровяном агаре через 12–18 ч образуют мелкие сероватые колонии, окруженные зоной гемолиза.

При культивировании на среде Вильсона — Блера в результате восстановления железа уже через 4–6 ч появляется сплошное почернение агара и сильное газообразование. Мозговая среда не чернеет.

Биохимические свойства. Протеолитические свойства *Cl. perfringens*: свернутую сыворотку и вареные кусочки мяса разжижают медленно — на 2–7-й день. Однако у большинства серотипов А протеолитическая активность выражена в значительной степени, они вырабатывают ферменты, разжижающие МПЖ уже через 24 ч. Характерной особенностью *Cl. perfringens* является способность свертывать лакмусовое молоко, при этом оно интенсивно створаживается с образованием губчатого сгустка.

Гликолитические свойства: все штаммы сбраживают с образованием кислоты и газа глюкозу, галактозу, мальтозу, лактозу, левулозу, сахарозу и не ферментируют маннит и дульцит.

Токсинообразование. На основании антигенного состава токсических факторов различают серовары А, В, С, D и F. *Cl. perfringens* вырабатывает сложный экзотоксин, образующий не менее 15 факторов патогенности. Сложный состав экзопро-

дуктов бактерий этого вида определяет его разностороннее повреждающее действие и спектр патогенности.

Устойчивость. Вегетативные клетки малоустойчивы, резистентность же спор, напротив, очень высокая. Имеются данные, что споры различных серотипов А и С более устойчивы и выдерживают кипячение и даже автоклавирование в течение 1–3 ч.

По антигенному составу токсических факторов различают шесть сероваров *C. perfringens* — А, В, С, D, Е, F, вызывающих следующие болезни: *C. perfringens* серовар А вызывает злокачественный отек у людей и животных, пищевую токсикоинфекцию у лошадей, энтеротоксемию у телят и свиней, некротический мастит у рогатого скота. *C. perfringens* В возбудитель анаэробной дизентерии у ягнят, телят, поросят, козлят, жеребят. *C. perfringens* С вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец, телят, поросят, ягнят, коз, верблюдов. *C. perfringens* D — возбудитель энтеротоксемии у овец, коз, телят, кроликов. *C. perfringens* Е выделяют при энтеротоксемии у телят и ягнят. *C. perfringens* F вызывает некротический энтерит людей.

2.6. ЭНТЕРОБАКТЕРИИ

ВОЗБУДИТЕЛЬ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА

Американские ветеринарные врачи Д. Сальмон и Т. Смит в 1885 г. выделили из органов свиней, павших от чумы, микроб, названный позже *Bact. suipestifer*. В 1888 г. А. Гертнер при выяснении этиологии отравления людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека. Он был назван *Bact. enteritidis*. В 1892 г. Ф. Леффлер выделил от павших мышей микроб, получивший название *Bact. typhimurium*. По фамилии Д. Сальмона микроорганизм, выделенный им, был назван сальмонеллой, а инфекционное заболевание и пищевое отравление, вызванное микробом, — сальмонеллезом.

В последние десятилетия сальмонеллы широко распространились во внешней среде, увеличилось количество бактерионосителей. В сточных водах мясоперерабатывающих предприятий сальмонеллы обнаруживают в 80–100% проб, в очищенных сточных водах — в 33–95% образцов, бактерии также обнаруживают

и в хлорированных сточных водах. Важным свойством сальмонелл является то, что они попадают во внешнюю среду только с фекалиями человека и животных, т. е. их обнаружение всегда свидетельствует о фекальном загрязнении.

Сальмонеллезы — группа инфекционных болезней преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных (телят, поросят, жеребят, ягнят, пушных зверей, птиц). Они являются возбудителями пищевых токсикоинфекций, возникающих при употреблении в пищу продуктов, в которых произошло массивное размножение бактерий и их лизис с выделением эндотоксинов.

В настоящее время известно более 2 тыс. серовариантов сальмонелл, объединенных в один род — *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Морфология. Сальмонеллы — мелкие палочки с закругленными концами 1–4 мкм длины и 0,3–0,8 мкм ширины, в мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму красятся отрицательно.

Культуральные свойства. Сальмонеллы — аэробы и факультативные анаэробы, оптимальная температура роста — 37°C, рН среды — 7,0–7,2, однако они развиваются и при рН ниже 7,0 и выше 8,0. Хорошо растут на обычных питательных средах — МПА, МПБ, средах Эндо и Левина, Плоскирева, висмут-сульфитном агаре и др.

Биохимические свойства. Сальмонеллы не ферментируют сахарозу, не разлагают лактозу, адонит, не расщепляют салицин и мочевины, не образуют индола; образуют сероводород; реакция Фогеса-Проскауэра — отрицательная, реакция с метиловым красным — положительная. Глюкозу ферментируют все типы сальмонелл с образованием газа, однако встречаются штаммы *S. typhimurium*, *S. typhisuis*, *S. abortusequi*, *S. dublin*, *S. anatum*, *S. gallinarum*, разлагающие глюкозу без образования газа. Большинство сальмонелл ферментируют маннит. Следует иметь в виду, что биохимическая активность у сальмонелл сильно варьирует.

Устойчивость. Сальмонеллы довольно устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. При температуре 60°C погибают в течение 1 ч, при 100°C — моментально. В почве и других объектах внешней среды сохраняются от 30

до 270, в трупах — до 100 дней; в яйцах — до 13, в яичном порошке — до 9 мес.; на замороженных овощах и фруктах — от 2 недель до 2,5 мес. Осветленный 0,3%-ный раствор хлорной извести при 30 мин экспозиции убивает сальмонеллы через 1 ч. Хлорирование сточных вод снижает загрязненность сальмонеллами в 6 раз.

Патогенность. Патогенные свойства сальмонелл обуславливают два вида токсинов: экзотоксин и эндотоксин.

Экзотоксины — продукты жизнедеятельности, активно продуцируемые в окружающую среду. Они — яды исключительно высокой активности, избирательно поражают отдельные органы и ткани.

Эндотоксин образуется в результате лизиса или разрушения клеток. Основной его компонент — полисахарид. Эндотоксины вызывают геморрагическое воспаление кишечника, кормовое отравление у свиней и плотоядных.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая прижизненная диагностика сальмонеллеза основана на исследовании крови (для выделения гемокультуры) и фекалий в первые четыре дня заболевания. Начиная с 14-го дня болезни, посылают сыворотку крови для серологического исследования и установления титра специфических антител.

Посмертно в лабораторию направляют паренхиматозные органы или части их (печень с желчным пузырем), мезентеральные лимфатические узлы.

Полученный материал засевают в МПБ, на МПА, дифференциальные и элективные среды — Эндо, Плоскирева или висмут-сульфитный агар. При подозрении на хроническое течение болезни дополнительно высевают материал на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера).

Полученные на средах культуры дифференцируют и идентифицируют на основании морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств согласно существующим наставлениям.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных формируется напряженный и длительный иммунитет. В стационарно неблагополучных по сальмонеллезу хозяйствах вакцинируют стельных коров концентрированной формолвакциной двукратно с 8-дневным интервалом за

30–45 дней до отела. Новорожденный с молозивом получает специфические антитела (колостральный иммунитет). Телят, полученных от вакцинированных коров, иммунизируют в возрасте 17–20 дней. Если не вакцинируют стельных коров, то телят от них вакцинируют с 8-10-дневного возраста двукратно с интервалом в семь дней.

ВОЗБУДИТЕЛЬ КОЛИБАКТЕРИОЗА

Escherichia coli в своей естественной среде обитания (содержимом толстого кишечника) — кишечная палочка, которая является комменсалом и, несомненно, играет положительную роль. В то же время в литературе многократно были описаны вспышки пищевых токсикоинфекций, вызванных энтеропатогенными штаммами кишечной палочки. Исследования антигенного строения *E. coli* показали, что возбудителями кишечных заболеваний являются определенные патогенные серологические типы *E. coli*:

- от телят чаще выделяются серогруппы 08, 09, 015, 0101 и др;
- от поросят — 08, 09, 0137, 0138 и др;
- от человека 026, 055, 0111 и некоторые другие серогруппы, в основном обладающие соматическим O-антигеном.

Эти типы относятся к энтеропатогенным.

Энтеропатогенные кишечные палочки вызывают следующие заболевания: колибактериоз молодняка, мастит у коров, острые кишечные заболевания у детей. Энтеропатогенные типы кишечных палочек выделяются и от здоровых людей и животных. Существует мнение, что основной причиной заболевания могут являться токсины, вырабатываемые кишечными палочками прижизненно, и, следовательно, заболевания можно рассматривать скорее как интоксикацию, чем токсикоинфекцию.

Морфология. *E. coli* — полиморфные палочки с закругленными концами, длиной 1–3 и шириной 0,3–0,6 мкм. Располагаются одиночно, по Граму красятся отрицательно, спор не образуют, подвижные (перетрихи), но встречаются и неподвижные.

Культуральные свойства. *E. coli* аэроб или факультативный анаэроб, оптимальная температура роста — 37–38°C, pH среды — 7,0–7,4. Хорошо растет на обычных питательных средах: на МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, с ровными

краями серо-белые колонии; на МПБ появляется интенсивное помутнение среды и наличие рыхлого осадка, легко разбивающегося при встряхивании.

Биохимические (ферментативные) свойства у бактерий *E. coli* хорошо выражены, в отличие от других бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Они сбраживают лактозу до кислоты и газа, что используется для дифференциации и идентификации.

К бактериям группы кишечной палочки (БГКП) отнесены три рода бактерий: *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter*. Два последних рода близки, но в отличие от *Escherichia* они имеют ограниченное санитарное значение и не расцениваются как показатели свежего фекального загрязнения, так как их чаще обнаруживают в почве, на растениях. В связи с неодинаковым санитарно-показательным значением отдельных родов в настоящее время для дифференциации *E. coli* фекального происхождения от других БГКП (*Citrobacter* и *Enterobacter*) предложен комплекс признаков, среди которых температурный и цитратный тесты являются основными, наиболее стабильными, позволяющими дифференцировать БГКП фекального происхождения от бактерий группы кишечных палочек, обитающих во внешней среде.

Устойчивость. Эшерихии устойчивы к воздействию факторов внешней среды. В почве они сохраняют жизнедеятельность от 6 до 11 мес., в навозе — до 11 мес., в воде — до 300 дней. При нагревании среды до 60°C они погибают в течение 10 мин, при 100°C — моментально. Губительно действуют обычные дезинфицирующие растворы: 2% -ный раствор активного хлора; 2,5% -ный раствор формальдегида; 2% -ный раствор гидроксида натрия; 3% -ный раствор однохлористого йода.

Лабораторная диагностика. Для бактериологического исследования в лабораторию направляют свежий труп, паренхиматозные органы, трубчатую кость и т. д. Исследования проводят согласно существующим наставлениям. Бактериологический диагноз на колибактериоз считают установленным при выделении культуры *E. coli* не менее чем из двух органов больного животного, патогенной для белых мышей.

Иммунитет и средства специфической профилактики. С целью создания колострального иммунитета проводят вакцинацию стельных коров, супоросных свиноматок, суягных овец.

Вакцину вводят согласно наставлению за 1–2 мес. до отела, опороса, окота.

Для профилактики и терапии колибактериоза используют поливалентную иммунную сыворотку согласно наставлению. С целью профилактики применяют бактериофаг паратифа и колибактериоза с питьем по определенной схеме в течение нескольких дней. Из средств активной терапии используют антибиотики с учетом чувствительности к ним выделенных эшерихий.

2.7. ВОЗБУДИТЕЛЬ АНТРОПОЗООНОЗНОЙ ЧУМЫ

Иерсинии (*Yersinia*) — род палочковидных грамотрицательных бактерий из семейства энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*). Для животных и человека патогенны *Yersinia pestis* — возбудитель антропозоонозной чумы; *Yersinia pseudotuberculosis* — возбудитель псевдотуберкулеза; *Yersinia enterocolitica* вызывает кишечный иерсиниоз.

Возбудитель антропозоонозной чумы (*Yersinia pestis*) вызывает острую инфекционную болезнь, характеризующуюся тяжелой интоксикацией, поражением лимфатической системы, тенденцией к септицемии. Чума — природно-очаговая болезнь, возбудитель которой в естественных условиях сохраняется благодаря циркуляции среди грызунов. Заражению здоровых животных способствуют переносчики, в первую очередь — блохи. Из сельскохозяйственных животных к чуме наиболее восприимчивы верблюды: заражаются в периоды интенсивной эпизоотии чумы грызунов и представляют собой опасный источник заражения людей.

Бактерию чумы открыли и выделили в чистой культуре в 1894 г. во время эпидемии чумы в Гонконге С. Китазато и А. Иерсен, по фамилии которого бактерия получила родовое название «иерсиния».

Морфология. *Yersinia pestis* — полиморфная грамотрицательная палочка 1–2 мкм в длину и 0,3–0,5 мкм в ширину. Спор не образует, жгутиков не имеет. При выращивании на влажных и кислых питательных средах при 37°C вокруг палочек образуется мукоидная оболочка в виде капсулы. В препаратах из органов и крови ее находят очень редко.

Бактерия чумы окрашивается биполярно всеми анилиновыми красителями, лучше всего синькой Леффлера и по Романовскому — Гимза. Микробы в форме палочек обнаруживают в мазках из органов и крови животных, погибших от острой формы чумы, при хроническом течении процесса бактерии шарообразной формы, плохо окрашиваются. В мазках на 1–2-суточных бульонных культурах возбудитель окрашивается биполярно и располагается в виде коротких и длинных цепочек, а в культурах на пластинке агара в чашке Петри — в виде мелких коротких палочек с плохо выраженной биполярностью; в препаратах из культур с влажного скошенного в пробирках МПА и особенно из конденсационной жидкости биполярная окраска четкая.

Культивирование. Факультативный анаэроб. Хорошо растет на обычных питательных средах при температуре 28–30°C и рН 7–7,2. Темп роста замедленный, поэтому в питательные среды добавляют различные стимуляторы (кровь, сульфат натрия и др.). На пластинках агара растет в виде блестящих, серовато-белых, прозрачных, суховатых колоний с выпуклым мелкозернистым центром и плоскими волнистыми краями, напоминающими кружева. Со временем центр колоний приобретает коричневый оттенок, становится более грубым и менее прозрачным. Колонии, выращенные при 37°C, маслянистые, легко суспендируются, иногда тянутся за петлей. На скошенном агаре в пробирке образует сероватый, вязкий, нежный, прозрачный налет. В бульоне отмечают агглютинативный рост с поверхностной нежной пленкой, при малейшем движении падающей на дно в виде сталактитов и образующей рыхлый осадок.

В первичных культурах чаще выделяют типичные шероховатые колонии R-формы, которые, как правило, вирулентные. При длительном культивировании возбудителя на искусственных питательных средах вырастают гладкие авирулентные S-формы. Среди них при определенных условиях могут быть и вирулентные клоны. Гладкие формы нестойки и при пересевах очень быстро образуют шероховатые и переходные формы.

Биохимические свойства. Бактерия чумы обладает определенной ферментативной активностью. Разлагает глюкозу, арабинозу, левулезу, мальтозу и маннит без газа. Лактозу и сахарозу обычно не сбраживает, молоко не свертывает, гемолитическая

активность непостоянна. Может выделять сероводород, индол не продуцирует. Мочевину не разлагает, метиленовый синий не редуцирует.

Антигенная структура. Выделено около десяти антигенов. Важнейшими из них являются оболочечный, или капсульный (фракция F₁), термолабильный белок и O-антиген — соматический термостабильный полисахарид. Оба антигена иммуногенны. У бактерий патогенных штаммов субстратом вирулентности служит антигенная система VW. Антиген V — белок клеточной стенки. W — липопроteid, выделяемый в процессе роста в среду. Комплекс VW угнетает фагоцитоз чумной палочки.

Существует специфический чумной бактериофаг, применяемый для индикации микроба.

Устойчивость. Бактерия чумы малоустойчива к действию физических и химических факторов. Вне организма погибает быстро. Низкие температуры переносит хорошо (при -22°C сохраняется 4 мес.). При кипячении гибнет через 1 минуту, сухой жар (100°C) убивает микроб через 20 мин. Чувствительна к дезинфектантам: 3% -ный раствор лизола убивает через 1,5 мин; 3% -ный раствор карболовой кислоты — через 5–10; 70% -ный спирт — через 3–5 мин.

Возбудитель чумы также чувствителен к стрептомицину, дигидрострептомицину, окситетрациклину, мономицину, гентамицину.

Патогенность. Вирулентность различных штаммов возбудителя чумы неодинакова, включая штаммы, изолированные от животных и людей. Бактерия чумы выделена более чем от 160 видов грызунов. Этот микроб патогенен для верблюдов, ослов, кошек, шакалов, лисиц, хорьков и ласок, которые могут заразиться в естественных условиях. Восприимчивы обезьяны и люди. Экспериментально удается заразить белых мышей, крыс, морских свинок, кроликов, сурков, песчанок, ондатр, водяных крыс и др. Морские свинки и белые мыши наиболее чувствительны, поэтому их используют для биопробы.

Возбудитель чумы вырабатывает токсические вещества типа эндо- и экзотоксинов. В составе последнего обнаружены две белковые фракции (А и В), различающиеся по аминокислотному составу и серологическим свойствам. Микроб

также имеет ферменты патогенности — фибринолизин и гиалуронидазу.

Лабораторная диагностика. Чума — высококонтагиозная инфекция, поэтому выделение и идентификацию ее возбудителя проводят в специальных противочумных лабораториях с соблюдением строгих мер предосторожности. Для диагностики применяют микроскопический, бактериологический и серологический методы. Мазки фиксируют полным погружением в жидкость Никифорова на 20 мин, остатки спирта сжигают. Обязательно окрашивают по Граму и на биполярность метиленовой синью по Леффлеру. Микроскопическое исследование имеет лишь ориентировочное значение.

Для подтверждения диагноза необходимо выделение чистой культуры. Материал засевают в МПБ, на МПА, агар и бульон Хоттингера. Культуры выращивают при 28–30°C в течение 12–24 ч.

Для дифференциации микроба ставят пробу с бактериофагом. Разработана также ускоренная реакция нарастания титра фага (РНФ) для ориентировочного диагноза чумы.

Биопробу ставят на белых мышках или морских свинках. Гибель животных, зараженных подкожно, наступает спустя 5–7 сут.

Серологические методы в основном используют для ретроспективной диагностики. Предложены РСК, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), нейтрализации антигена (РНАг) и нейтрализации антител (РНАт). При эпизоотическом обследовании чаще применяют РНГА. Для обнаружения антигена чумного микроба в организме животных рекомендуется реакция иммунодиффузии в геле.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет животных на устойчивость к данной бактерии изучен недостаточно. Считается, что невосприимчивость индуцирует протективный антиген. Ведущее значение в антиинфекционном иммунитете при чуме принадлежит клеточной защите (Т-лимфоцитам).

Для профилактики чумы человека разработаны живые и инактивированные вакцины. Наибольшее распространение получила живая вакцина из оригинального штамма EV. Эту же вакцину можно использовать для вакцинации верблюдов.

2.8. ВОЗБУДИТЕЛЬ БРУЦЕЛЛЕЗА

Бруцеллы входят в род *Brucella*, который включает шесть видов: *B. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. melitensis* — овец и коз; *B. suis* — свиней; *B. canis* — собак; *B. neotomae* — кустарниковых крыс; *B. ovis* — инфекционного эпидидимита баранов.

Бруцеллы были обнаружены в 1886 г. Д. Брюсом при микроскопии мазков из селезенки солдата, умершего от мальтийской лихорадки, а в 1887 г. этот же ученый выделил чистую культуру и возбудителя назвал *Micrococcus melitensis*. Б. Банг и В. Стриболт в 1897 г. из околоплодной жидкости коровы выделили второй вид — *Bac. abortus bovis*. А в 1914 г. Дж. Траум выделил от абортировавшей свиньи третий вид — *B. abortus suis*. В 1920 г. Майер и Физье объединили все эти три микроба в одну группу и назвали бруцеллами, по фамилии открывшего их ученого Д. Брюса.

Бруцеллы являются возбудителями бруцеллеза — хронической инфекционной болезни животных и человека. Резервуар и источник инфекции — домашние животные (овцы, козы, коровы, свиньи, реже собаки). Патогенными для человека являются *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*. Заболеваемость людей бруцеллезом носит, прежде всего, профессиональный характер. Человек заболевает при непосредственном контакте с больными животными, а также при употреблении в пищу зараженных продуктов — мяса, молока и т. д.

Морфология. Бруцеллы — мелкие коккобактерии (0,3–0,6 мкм) или палочки (0,6–2,5 мкм), грамотрицательные, в окрашенных препаратах располагаются одиночно и небольшими группами. Неподвижные, спор не образуют. Мукоидные и гладкие варианты синтезируют микрокапсулу.

Культивирование. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при температуре 36–38°C и рН 6,8–7,2. Однако для их культивирования используют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (МППБ); мясопептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГГА); печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГГБ, ПГГА) с 1% глюкозы и 2–3% глицерина; картофельный агар; сывороточно-декстрозный агар и др. При первичном выделении они растут

очень медленно, в среднем 15–20 сут., в то время как старые культуры вырастают уже через 24–48 ч.

Биохимические свойства. Сахаролитическая активность у бруцелл выражена слабо. Они утилизируют углеводы, но не образуют кислоту и газ в количествах, достаточных для их идентификации. Нитраты редуцируют в нитриты. Молоко не свертывают, желатин не разжижают. Некоторые виды гидролизуют аминокислоты с образованием аммиака.

Устойчивость. Бруцеллы малоустойчивы к действию различных физических и химических факторов. Агаровые культуры в запарафинированных пробирках сохраняются несколько недель, лиофильно высушенные — годами. Прямые солнечные лучи убивают их за 4,5 ч. В воде бруцеллы выживают более 5 мес., в поверхностном слое почвы — 40 сут., на глубине 5–8 см — до 3 мес., в навозе при медленном высушивании — до 120 сут., в моче коров — до 4 сут., в почве зимой — 4–5 сут., в высушенных околоплодных оболочках — до 120 сут. В охлажденном молоке сохраняются 6–8 сут., в кислом молоке — 1–4, в масле — 40–60, в сырах — более 42, в брынзе (5–11% -ный раствор поваренной соли) — 45–60, в замороженном мясе — свыше 320 сут., в засоленных шкурах — 2 мес., в шерсти — до 3–4 мес.

При температуре 60°C бруцеллы погибают через 30 мин, при 80–85°C через 5 мин, при 100°C мгновенно. Пастеризацию молока проводят при 85–90°C 30 мин.

Дезинфицирующие растворы — 2% -ный фенол; 1% -ный креолин; 1–2% -ный формалин; 0,5–1% -ный хлорамина; 1% -ная соляная кислота; 3% -ный гидроксид натрия; 5% -ная хлорная известь убивают бруцеллы в течение нескольких минут.

Патогенность. Образование экзотоксинов у бруцелл не установлено, их патогенное действие связано с эндотоксином. Они также синтезируют гиалуронидазу, каталазу, уреазу. Бруцеллы высокоинвазивны, могут проникать через неповрежденные слизистые покровы пищеварительного тракта, легких, глаз и кожу. К ним восприимчивы овцы, козы, крупный рогатый скот, буйволы, свиньи, лошади, мулы, верблюды, северные олени, собаки, кошки и многие дикие животные. Каждый вид бруцелл поражает животных определенного вида, но бруцеллы могут мигрировать, заражая животных другого вида. Для человека наиболее опасен вид *B. melitensis*.

Возбудитель проникает в организм человека через поврежденную кожу, слизистую оболочку дыхательных путей и желудочно-кишечный тракт при оказании помощи больным животным, при патологических родах. В странах, где отсутствует массовая пастеризация молока, бруцеллез более распространен.

Лабораторная диагностика. Для диагностики бруцеллеза используют бактериологический, биологический, серологический и аллергический методы.

В лабораторию направляют абортированный плод с плодовыми оболочками или желудок плода с содержимым, кусочки печени селезенки, содержимое гигром, абсцессов, молоко; от убитых животных — лимфоузлы, кусочки паренхиматозных органов, костный мозг, матку, яичники, семенники, вымя; от баранов — семенники с придатками. Для серологического исследования направляют кровь или сыворотку крови и молоко.

Бактериологическое исследование. Патологический материал высевают на ПГГБ, ПГГА, МППБ, МППГГА или сывороточный декстрозный агар. С целью подавления посторонней микрофлоры в питательные среды можно добавлять генцианвиолет (1:200 000) или кристаллиолет (1:100 000). При исследовании материала от крупного рогатого скота одну часть посевов инкубируют в атмосфере с содержанием 10–15% CO₂, другую — в обычных условиях. Для выделения культур *B. ovis* и *B. abortus* используют плотные или полужидкие печеночно-сывороточный или печеночно-аминопептидный агар при содержании 10–15% CO₂. *B. melitensis* растет в обычных атмосферных условиях. Посевы инкубируют при 37–38°C в течение 30 сут.

Культуры бактерий, обладающие типичными морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами, дающие положительную РА с позитивной бруцеллезной сывороткой, относят к бруцеллам.

Виды бруцелл дифференцируют по способности роста в отсутствие повышенной концентрации CO₂, выделению H₂S, чувствительности к фагу, бактериостатическому действию некоторых анилиновых красок и агглютинации моноспецифическими сыворотками.

Биопробу осуществляют на двух морских свинках, у которых на 15, 25 и 40-е сутки после заражения берут кровь, полу-

чают сыворотку и исследуют ее в пробирочной РА в титрах от 1:10 до 1:80. Результат считают положительным, если обнаружена положительная РА в титре 1:10 и выше. Для выделения чистой культуры бруцелл морских свинок убивают и делают посевы из лимфоузлов, селезенки, печени и костного мозга.

Серологические методы. Применяют пробирочную реакцию агглютинации (РА), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), пластинчатую реакцию агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба — РБП) и кольцевую реакцию с молоком (КР).

РА ставят в объеме 1 мл с единым бруцеллезным антигеном для РА, РСК и РДСК. Сыворотки крови овец, коз, буйволов, оленей и собак исследуют в разведениях 1:25, 1:50, 1:100, 1:200; крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов — 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400. РА считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов, начиная с разведения 1:100 (100 МЕ); овец, коз, буйволов, оленей и собак — с 1:50 (50 МЕ) с оценкой не менее чем на два креста. Сомнительной — при наличии агглютинации только в разведении 1:50 (50 МЕ) с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов и 1:25 (25 МЕ) — с сыворотками овец, коз, буйволов, оленей и собак с оценкой не менее чем на два креста.

РСК — специфичный и высокочувствительный метод диагностики бруцеллеза животных. Ее показания более постоянны и сохраняются дольше: комплементсвязывающие антитела появляются позже, чем агглютинины. Эта реакция позволяет выявить большее количество больных в стадах с давней инфекцией. РСК применяют при диагностике бруцеллеза у вышеперечисленных видов животных, а также свиней.

РДСК — более чувствительный тест, чем РСК. При инфекционном эпидидимите баранов используют только РДСК с овисным антигеном.

РБП используют для исследования сывороток крови крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, буйволов, верблюдов и оленей. Реакцию проводят при температуре 18–30°C с бруцеллезным антигеном, окрашенным бенгальским розовым, на пластинках с лунками. При положительной реакции в течение 4 мин появляются хлопья агглютината розового цвета.

КР ставят с цельным свежим или консервированным формалином молоком коров и антигеном взвесью убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином. При наличии в молоке специфических антител происходит агглютинация антигена, образовавшийся комплекс адсорбируется сливками молока и поднимается с ними вверх, образуя четкое фиолетовое кольцо. Эту реакцию ставят на рынках для проверки благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота.

Для выявления бруцелл непосредственно в патологическом материале, а также в объектах окружающей среды предложен прямой метод иммунофлюоресценции (РИФ); непрямой метод позволяет обнаружить антитела в сыворотке крови больных, переболевших или вакцинированных животных.

Аллергический метод. Для аллергической диагностики бруцеллеза овец, коз и свиней используют бруцеллин ВИЭВ, приготовленный из неагглютиногенного и авирулентного штамма *B. abortus* В-1. У овец и коз применяют пальцебральную пробу, свиньям препарат вводят внутрикожно с наружной стороны ушной раковины. У животных, больных бруцеллезом, на месте введения бруцеллина развивается воспалительная реакция.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при бруцеллезе инфекционный, который постепенно переходит в постинфекционный и сопровождается освобождением организма от возбудителя.

Для специфической профилактики бруцеллеза были предложены живые и убитые вакцины. Применяется живая вакцина из штамма № 19 *B. abortus*, сухая живая вакцина из слабоагглютиногенного штамма № 82 *B. abortus*. Против бруцеллеза мелкого рогатого скота — сухая живая вакцина, приготовленная из культуры *B. melitensis* штамма Рев-1.

Профилактика заболеваний человека определяется эффективностью профилактики бруцеллеза среди животных. Снижению заболеваемости способствует элементарное соблюдение правил личной гигиены и режима обработки сельскохозяйственной продукции, например обязательной пастеризации молочных продуктов.

Количество бруцелл в молоке от больных животных может достигать до десятков тысяч в 1 мл. Молоко от коров, положительно реагирующих на бруцеллез, перерабатывают на топле-

ное молоко или кипятят в течение 5 мин, после чего используют только внутри хозяйства. Молоко, полученное от коров оздоровливаемого стада, запрещается направлять на рынок, в столовые и на маслозавод. Его обезвреживают путем пастеризации в хозяйстве при 70°C в течение 30 мин или при 85°C — 20 с. Если нет пастеризатора, то молоко кипятят, после чего вывозят на маслозавод или используют внутри хозяйства.

2.9. ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ

Возбудитель туляремии — франциселлы — очень мелкие полиморфные бактерии. Род *Francisella* представлен двумя видами, один из них — *Francisella tularensis* — патогенный. Этот вид вызывает туляремию, природно-очаговую инфекционную болезнь животных, характеризующуюся лихорадкой, параличами у молодняка, увеличением лимфатических узлов, абортами.

Морфология. В окрашенных мазках возбудитель туляремии имеет кокковидную или палочковидную форму 0,3–0,7 мкм в длину и 0,2–0,4 мкм в ширину. Кокковидные формы чаще находят в культурах, палочковидные — в организме животных.

Микроб неподвижен, спор не образует, имеет небольшую капсулу; в культурах продуцирует слизь, легко обнаруживаемую при изготовлении мазков. В мазках-отпечатках из органов павших животных хорошо красится по Романовскому — Гимза, приобретающая сиреневый цвет. В тканях бактерии биполярно не окрашиваются, чем и отличаются от пастерелл.

Культивирование. Возбудитель туляремии не растет на обычных питательных средах. Для ее культивирования применяют свернутую желточную среду Мак-Коя (60% желтка куриных яиц и 4% физиологического раствора). Используют также среду Френсиса (2,5% мясопептонного агара, 0,1% цистина, 1% глюкозы и 5–10% дефибринированной кроличьей крови), полужидкую желточную среду Дрожжевиной (10% куриного желтка и 90% стерильного физиологического раствора), кровяной рыбно-дрожжевой агар с глюкозой и цистином и др.

Туляремийная бактерия — строгий аэроб. Оптимум температур 36–37°C, pH среды 7,0–7,2. На свернутой желточной среде микробы растут в виде блестящего тонкого налета с извилистой

(«шагреновой») поверхностью; при скудном росте вырастают небольшие блестящие выпуклые колонии. Колонии патогенных штаммов имеют S-форму. В жидких питательных средах туляремийный микроб растет значительно хуже (только на поверхности среды).

Биохимические свойства. Бактерия туляремии не обладает выраженной биохимической активностью. Микроб ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, в ряде случаев — левулезу и маннозу; не сбраживает лактозу, сахарозу, рамнозу, маннит; образует сероводород и редуцирует тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Устойчивость. В воде или влажной почве при 4°C сохраняется без снижения вирулентности свыше 4 месяцев, в воде при 20–25°C — 10–15 сут., в зерне и соломе при температуре ниже 0°C — до 6 мес., при 8–12°C — 56 сут., при 20–30°C — не более 20 сут. В замороженном мясе возбудитель жизнеспособен до 93 сут., в молоке и сливках при 8–10°C — не менее 3 нед., в замороженном молоке — до 104 сут. В замороженных трупах животных, павших от туляремии, — свыше 3 мес., в их шкурах при 8–12°C — более месяца, при 32–33°C — 1 нед. Микроб устойчив к высушиванию.

Особенно чувствителен к этиловому спирту (погибает через 0,5–1 мин). Неустойчив к обычным дезинфектантам — лизолу, фенолу, креолину, но наиболее к хлорной извести. Чувствителен ко многим антибиотикам — стрептомицину, левомецитину, тетрациклину, неомицину, канамицину; устойчив к пенициллину.

Патогенность. Бактерия патогенна для зайцев, полевок, домовых мышей, сусликов, крыс. Сельскохозяйственные животные относительно устойчивы к туляремии, заболевают спорадически, болезнь часто протекает в скрытой форме. Наиболее восприимчивы ягнята и поросята, болеют лошади, ослы. Чувствительны буйволы, верблюды, северные олени. Взрослые овцы устойчивы к заболеванию, еще более резистентны козы. Восприимчивы кролики, болезнь у которых протекает без характерных признаков и может иметь сходство с псевдотуберкулезом и хронической формой пастереллеза. Из птиц восприимчивы куры, особенно цыплята. К заражению чувствительны морские свинки и белые мыши.

Туляремией болеет и человек, однако заболевание протекает относительно доброкачественно и больной не представляет опасности для окружающих.

Патогенез. Заражение происходит алиментарным, воздушно-капельным и трансмиссивным путями. Бактерии могут проникать в организм через неповрежденные кожные покровы, конъюнктиву и дыхательные пути. Возбудитель, размножаясь на месте внедрения, сначала попадает в лимфатические узлы, затем проникает в кровь и вызывает септицемию.

Лабораторная диагностика. При взятии, доставке в лабораторию и исследовании материала на туляремию необходимо соблюдать меры предосторожности, предусмотренные правилами работы с особо опасными инфекциями. Материалом для исследования служат печень, почки, селезенка, увеличенные лимфатические узлы, взятые от трупов крупных животных; трупы грызунов направляют целиком.

Схема исследования материала включает бактериоскопию, выделение чистых культур и биологическую пробу.

Мазки-отпечатки из органов животных окрашивают по Романовскому — Гимза, учитываются большие скопления коккобактерий сиреневого цвета. Бактериоскопию следует рассматривать как ориентировочный метод.

Для индикации бактерий используют реакцию прямой иммунофлюоресценции, однако этот метод является ориентировочным, и положительные результаты должны подтверждаться выделением культуры возбудителя. Для этой цели проводят посев патологического материала на специальные питательные среды. Свежевыделенную культуру идентифицируют по морфологическим, тинкториальным свойствам, характеру роста на свернутой желточной среде, отсутствию роста на обычных питательных средах, а также по результатам пробирочной РА со специфической агглютинирующей сывороткой.

Биологическая проба. Это самый чувствительный и надежный метод для обнаружения туляремийных бактерий в любом материале. Заражают белых мышей, реже морских свинок. Суспензию из кусочков органов и лимфатических узлов вводят в дозе 0,5 мл подкожно или интраперитонеально или втирают в свежестриженный участок кожи. Белые мыши погибают через 3–4 сут., иногда через 8–12 сут., морские свинки — на 4–6-е сутки.

Серологический диагноз. Осуществляют с помощью реакций агглютинации, преципитации, непрямой гемагглютинации и реакции нейтрализации.

РА — достаточно точный метод исследования на туляремию. Антигеном служит туляремийный диагностикум, взвесь из микробных клеток, убитых формалином. РА ставят двумя способами: пробирочным и кровяно-капельным. Диагностические титры при туляремии нужно считать следующим образом: для овец — 1:25; для крупного рогатого скота и свиней — 1:100.

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставят с эритроцитами, сенсibilизированными туляремийным антигеном или с антительным эритроцитарным диагностикумом.

Аллергический метод. Гиперчувствительность замедленного типа у животных при туляремии развивается рано и сохраняется длительное время, поэтому аллергический метод может быть использован для ранней и ретроспективной диагностики. Аллергеном служит тулярин; препарат вводят внутрикожно, реакцию учитывают дважды — через 24 и 48 ч.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У животных, переболевших туляремией, создается стойкий и длительный иммунитет, имеющий в своей основе тканевые и гуморальные механизмы. В сыворотках переболевших животных обнаруживают агглютинины, довольно рано формируются клеточные реакции защиты. Для сельскохозяйственных животных вакцина не разработана.

Для профилактической иммунизации человека применяют сухую живую вакцину против туляремии, предложенную в 1946 г. Н. А. Гайским и Б. Я. Эльбертом.

2.10. ВОЗБУДИТЕЛЬ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА

Пастереллез (геморрагическая септицемия) — инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, в том числе птиц, характеризующаяся явлениями септицемии и воспалительно-геморрагическими процессами во внутренних органах, на серозных и слизистых оболочках.

Впервые возбудителя холеры кур в чистой культуре выделил Л. Пастер в 1880 г. В 1910 г. данному возбудителю было присвоено название *Pasteurella* по фамилии открывшего его.

По современной классификации пастереллы объединены в секцию V, семейство *Pasteurellaceae*, в котором один род *Pasteurella*. Он представлен шестью видами. Основные возбудители болезни — *Pasteurella multocida* и *Pasteurella gemolytica*.

Морфология. *P. multocida* в мазках-отпечатках из органов и крови, окрашенных метиленовой синью, имеют вид биполярно окрашенных бактерий. В препаратах из культур пастереллы имеют вид овоидных палочек длиной 0,4–1,2 мкм и шириной 0,3–0,4 мкм, располагаются одиночно, реже в виде коротких цепочек, неподвижные, спор не образуют.

Культуральные свойства. *P. multocida* — факультативный анаэроб. Оптимум температуры — 37–38°C, pH среды — 7,2–7,4. На МПА образуют мелкие, круглые S-формы прозрачные колонии. В МПБ — слабое равномерное помутнение среды и образование на дне пробирки осадка, поднимающегося при встряхивании в виде слизистой косички.

Пастереллы ферментируют с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит, не ферментируют лактозу, дульцит, аденин. Образуют индол, не разжижают желатин, на кровяном агаре не вызывают гемолиза, проба на каталазу положительная.

Устойчивость *P. multocida* в окружающей среде невысокая, при 58°C погибают за 20 мин, при 90°C — за 10 мин, при кипячении — моментально. Выдерживают замораживание до –70°C. При высушивании на открытом воздухе гибнут за 2–3 сут. В почве выживают до 12 сут., в навозе — до 14, птичьим помете — до 72 сут., в гниющих трупах — до 3 мес. Дезинфицирующие растворы в принятых концентрациях (раствор, содержащий 5% активного хлора, 3%-ные растворы формальдегида и гидроксида натрия) убивают пастерелл в течение 10 мин.

Патогенность. Патогенные и вирулентные свойства пастерелл варьируют и наиболее сильно выражены у животных того вида, от которого они выделены.

Диагностика. Для выделения пастерелл используют только свежий патологический материал. Для первичного выделения и культивирования пастерелл применяют обогащенные питательные среды, в том числе МПА с 5–10% крови барана или сывороточный МПБ. Посевы из внутренних органов инкубируют в термостате при 37°C в течение 24–48 ч. Из патологического

материала готовят мазки и окрашивают по Граму, Романовскому — Гимза или синькой Леффлера.

Вирулентность выделенной культуры определяют путем постановки биологической пробы. Белых мышей и кроликов заражают выделенной культурой подкожно в дозе 0,2–0,5 мл. Через 24–48 ч после заражения подопытные животные погибают.

На основании морфологии, культурально-биохимических свойств и биопробы ставят диагноз на пастереллез.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных образуется нестерильный иммунитет. После вакцинации они (а также птицы) могут оставаться пастереллоносителями.

Для активной иммунизации применяют видоспецифичные эмульгированные вакцины отдельно для каждого вида животных.

Для профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Пастереллы высокочувствительны к гентамицину, левомицетину, стрептомицину, тетрациклинам и некоторым сульфаниламидным препаратам.

2.11. ВОЗБУДИТЕЛЬ САПА ЛОШАДЕЙ

Сап — инфекционная болезнь цельнокопытных (лошадь, осел, мул), протекающая преимущественно хронически. В естественных условиях могут болеть также хищники семейства кошачьих, верблюды и человек.

Возбудитель *Burkholderia mallei* был открыт в 1882 г. Ф. Леффлером и А. Шютц. Он отнесен к семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*, виду *Burkholderia mallei*.

Морфология. *Burkholderia mallei* — прямая или слегка изогнутая палочка, 1–5 мкм в длину, 0,3–0,8 мкм в ширину. Спор и капсул не образует, неподвижная, грамотрицательная. Нередко обнаруживаются ветвящиеся, булавовидно утолщенные палочки, а также кокковидные формы. При окраске по Романовскому — Гимза и синью Леффлера выявляется зернистость.

Культивирование. Возбудитель растет на простых питательных средах при pH 6,8–7,2, лучше с добавлением 2–4% глицерина. Культивируется в аэробных условиях, температурный оптимум — 37°C, ниже 20°C и выше 40°C не растет. На МПА с

глицерином на вторые сутки появляется слизистый серовато-белый налет с перламутровым оттенком, который постепенно приобретает коричневый цвет. В МПБ с глицерином вначале отмечается равномерное помутнение среды, образование пристеночного кольца и пленки с последующим образованием слизистого серо-белого осадка. Особенно характерен рост палочки сапа на ломтиках картофеля — образуется налет, по цвету напоминающий мед.

Возбудитель ферментирует глюкозу, лактозу без газа; не ферментирует мальтозу, маннит, сахарозу; индола не образует; желатин разжижает.

Устойчивость. В окружающей среде возбудитель малоустойчив. В воде и гниющем материале микроб гибнет через 1–30 сут., при нагревании до 80°C — через 5 мин, при 100°C — мгновенно, солнечные лучи убивают его через сутки. Для уничтожения возбудителя во внешней среде используют хлорную известь с содержанием не менее 5% активного хлора, 4%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор лизола.

Патогенность. Основным фактором патогенности служит эндотоксин. Антигены микробной клетки вызывают гиперчувствительность замедленного типа. Из лабораторных животных к нему чувствительны кошки, морские свинки и золотистые хомяки.

Возбудитель сапа, попав в организм, через лимфатические пути и кровь проникает в легкие и другие внутренние органы. На слизистых оболочках носовой полости, глотки, трахеи и бронхов распадающиеся сапные узелки образуют язвы с изрытыми неровными краями и саловидным дном.

Лабораторная диагностика. Бактериологическое исследование проводят редко. Материалом для исследования служат слизь из носа, содержимое язв, пораженные органы, лимфоузлы. Из материала готовят суспензию и вводят морским свинкам подкожно в области шеи. На месте введения развивается процесс с формированием абсцессов. Гибель наступает через 1–2 нед.

Основной метод лабораторной диагностики сапа — *серологический* (РА, РСК, МФА, ИФА и РНГА). РСК ставят главным образом при хронической форме болезни. В практике широко используют *аллергический* метод, основанный на применении маллеина (аллергический препарат для диагностики сапа).

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при сапе клеточный, нестерильный, изучен слабо. В сыроворотке крови зараженных животных появляются комплемент-связывающие антитела, через 17–24 сут. развивается гиперчувствительность замедленного типа. Переболевание сапом не предохраняет от повторного заболевания.

Специфическая профилактика не разработана. Больных животных уничтожают.

2.12. ВОЗБУДИТЕЛИ НЕКРОБАКТЕРИОЗА, КОПЫТНОЙ ГНИЛИ И МЕЛИОИДОЗА ЖИВОТНЫХ

ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕКРОБАКТЕРИОЗА

Некробактериоз (*Necrobacteriosis*) — инфекционная болезнь многих видов домашних и диких млекопитающих животных, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями кожи, слизистых оболочек, внутренних органов и конечностей.

В 1881 г. Р. Кох выделил возбудителя некробактериоза, а в 1882 г. он был подробно описан Ф. Леффлером.

Морфология. Возбудитель — *Fusobacterium necrophorum*, входит в род *Fusobacterium* (веретенообразных). Это полиморфный неподвижный микроорганизм, спор и капсул не образует, грамтрицательный. В мазках из свежего материала имеет вид отдельных палочек шириной 0,5–1,5 и длиной 1,5–3,0 мкм или длинных нитей (от 30 до 400 мкм). Хорошо красится фуксином Циля, синькой Леффлера, а также по методу Муромцева. При окраске обычными анилиновыми красителями окрашивается неравномерно.

Культивирование. Фузобактерии — облигатные анаэробы. Выделение чистой культуры возбудителя из гнойно-некротических поражений нижних частей конечностей сопряжено с трудностями, главным образом вследствие ассоциации с другими микробами, особенно стрептококками и стафилококками.

Чистую культуру легче получить из внутренних органов пораженного животного — печени, селезенки, легких. Из нек-

ротической ткани кожи материал берут из участков, граничащих со здоровой тканью (прижизненные соскобы).

Для культивирования возбудителя используют среду Китта — Тароцци, бульон Мартена, печеночный бульон Хоттингера, сывороточный и глюкозо-кровяной агары, полужидкий агар, мозговую среду. Добавление к среде Китта — Тароцци 10–20% свежей бычьей сывотки, 0,2–0,5% глюкозы или дрожжевого экстракта приводит к более интенсивному росту микроорганизма. В среде Китта — Тароцци через 24–48 ч происходит помутнение среды, на 5–8 сут. наступает просветление среды и выпадение крошковидного осадка, разбивающегося при встряхивании в равномерную муть. При посеве в сывороточный агар (столбиком) на 3–4 сут. в глубине среды появляются небольшие чечевицеобразные колонии, от которых отходят волокнистые отростки.

На поверхности глюкозо-кровяного агара бактерии растут при создании анаэробных условий, на 2–3 сут. появляются мелкие розинчатые колонии, иногда колонии окружены незначительной зоной гемолиза. Поверхность колоний гладкая, матовая.

Микроорганизм хорошо растет на мозговой среде и при добавлении 0,05% сернокислого железа. Среда чернеет за счет образования сероводорода.

Биохимические свойства. Фузобактерии — хемоорганотрофы, одни из них обладают сахаролитической активностью, другие не ферментируют сахара, но зато ферментируют пептоны. *Fusobacterium necroforum* ферментирует с образованием кислоты и газа арабинозу, глюкозу, галактозу, левулезу, мальтозу, сахарозу, салицин. Слабо ферментирует лактозу. Желатин и свернутую сыворотку не разжижает; не свертывает яичный белок; слабо и непостоянно пептонизирует молоко; образует индол и сероводород. Аммиак не вырабатывает. Не восстанавливает нитраты в нитриты. Различная биохимическая активность фузобактерии может быть использована для их идентификации.

Устойчивость. Возбудитель некробактериоза — относительно нестойкий микроб, но длительное время сохраняет жизнеспособность в объектах окружающей среды.

При воздействии прямых солнечных лучей погибает через 12 ч, в замороженном состоянии бактерии выживают 30–40 сут. При нагревании до 65°C они гибнут в течение 15 мин.,

при 70°C — через 10 мин, при кипячении — мгновенно; 5%-ные растворы гидроксида натрия или калия убивают их через 10 мин, 2,5%-ный раствор креолина — через 20, 5%-ный лизол — через 9, 2%-ный фенол убивает через 2 мин.

Фузобактерии могут долгое время сохраняться и размножаться в слежавшемся навозе, на это указывает частота заболеваний при нахождении животных в обильно унавоженных местах.

Патогенность. В естественных условиях некробактериозом болеют лошади, крупный рогатый скот, буйволы, олени, овцы, козы, свиньи, собаки, кошки, куры, гуси, а также дикие животные — косули, лоси, архары, антилопы, ламы, зебры, бегемоты, бобры, сурки, суслики. К некробактериозу восприимчив и человек. Из лабораторных животных особо чувствительны к нему кролики и белые мыши. В форме тяжелых эпизоотий и энзоотий с высокой смертностью некробактериоз наблюдают у оленей, крупного рогатого скота, овец, свиней.

Естественным резервуаром возбудителя в природе служит желудочно-кишечный тракт здоровых животных. Заражение происходит по типу раневой инфекции через поврежденную кожу или слизистые оболочки. Возбудитель передается через почву, подстилку, корма, предметы ухода за животными.

Лабораторная диагностика осуществляется на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Для некробактериоза характерно наличие гнойно-некротических поражений нижних частей конечностей, кожи лицевой части головы, вымени, слизистых оболочек ротовой полости, половых органов. В лабораторию направляют кусочки пораженных органов и тканей с прилегающей здоровой тканью, целые трупы мелких животных, птиц.

Для прижизненного исследования берут некротические поражения на границе омертвевшей и здоровой тканей после предварительной очистки от распавшейся ткани и гноя. Из этих же участков готовят препараты-отпечатки. При поражении ротовой полости берут слюну больного животного. Патологический материал консервируют в случае необходимости в 30%-ном стерильном глицерине.

Мазки, приготовленные из некротизированной ткани, фиксируют спирт-эфиром 10 мин и окрашивают синькой Леффлера

или по методу Муромцева, Романовского — Гимза, а также по Граму. В мазках обнаруживаются зернисто окрашенные нити или тонкие длинные грамотрицательные палочки.

Для посевов на среды используют кусочки некротизированной ткани, отобранной на границе со здоровой, которые помещают в среду Китта — Тароцци с добавлением 10% свежей крови и 0,5% глюкозы при pH 7,4–7,6. Посевы инкубируют до 3 сут. при 36–38°C. Культуры выращивают в анаэробных условиях. Одновременно проводят биопробу. Кролика заражают подкожно с наружной стороны уха в дозе 0,5–1 мл. Через 2–4 сут. на месте введения развивается некротический очаг, на 6–10 сут. кролик обычно погибает. При вскрытии обнаруживают некротические очаги в мышцах головы, брюшной стенки, сердца, в печени.

Белых мышей заражают бульонной культурой в дозе 0,3–0,5 мл подкожно в области корня хвоста. Мыши погибают на 10–14 сут. с явлениями некроза мышц, гнойными очагами в печени, легких, сердце.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают нестойкий иммунитет.

Для специфической профилактики разработан «Нековак» — ассоциированная вакцина против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота. Лечение проводят комплексно на специально оборудованных для этой цели площадках с помощью химиопрепаратов, сульфаниламидов и антибиотиков тетрациклинового ряда, пенициллинов и др.

ВОЗБУДИТЕЛЬ КОПЫТНОЙ ГНИЛИ

Возбудитель — *Bacteroides nodosus* относится к семейству *Bacteroidaceae*, роду *Bacteroides*, вызывает инфекционную болезнь у овец и коз, характеризующуюся мацерацией и воспалением кожи свода межкопытной щели, прогрессирующим гнойно-гнилостным распадом копытного рога и хромотой.

Болезнь регистрируют во всех странах мира, где развито овцеводство, главным образом в зонах с повышенной влажностью, на сырых пастбищах.

Морфология. Возбудитель — крупная (6–8 мкм) прямая или слегка изогнутая, грамотрицательная, неподвижная, полиморф-

ная палочка с утолщениями на одном или обоих концах. Спор и капсул не образует. По внешнему виду напоминает гантели.

Культивирование. *Bact. nodosus* — облигатный анаэроб. Весьма требователен к составу питательных сред, его удастся культивировать в полужидкой среде Китта — Тароцци и жидкой питательной среде из экстракта головного мозга с добавлением 2–5% триптического перевара порошка копытного рога. На этих средах микробы растут в виде тяжей, на дне пробирки образуют осадок. На лактоальбуминовом агаре вырастают плоские блестящие шероховатые колонии.

Устойчивость возбудителя к факторам окружающей среды незначительная. На пастбищах микроб сохраняется не более двух недель. Нагревание до 90°C убивает его за 1 мин. Дезинфицирующие растворы креолина (3%), формалина (0,5%), фенола (2%) убивают в течение 15–20 мин. При доступе воздуха он погибает через 24 ч, однако в пораженном роге сохраняется до трех лет.

Лабораторная диагностика. Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических и клинических данных, результатов бактериологической диагностики и биологической пробы.

Бактериологическая диагностика осуществляется по общепринятой методике. Для исследования берут свежепораженные участки основы кожи копытцев и слизь, покрывающую кожу межпальцевых щелей. Для биопробы используют ягнят.

Для серологической диагностики копытной гнили предложена РСК. Комплементсвязывающие антитела у животных появляются с началом заболевания, достигают максимальных значений в разгар болезни и угасают с исчезновением клинических признаков. Идентифицировать возбудителя можно при помощи непрямого метода иммунофлюоресценции.

Данную болезнь следует отличать от некробактериоза, ящюра, эктимы, оспы, травматического повреждения копыт.

Иммунитет изучен недостаточно. Установлено, что в сыворотке крови больных и вакцинированных животных появляются агглютинины к О- и К-антигенам возбудителя, а также комплементсвязывающие антитела. Для активной иммунизации в ряде зарубежных стран (Англия, Австрия, Чехия, Словакия) применяют инактивированные вакцины.

Лечение. Больных копытной гнилью животных лечат или убивают. Для лечения используют ножные ванны с 10%-ным раствором сульфата цинка и 5–10%-ным раствором формалина, 10–12%-ным раствором медного купороса. С лечебной целью рекомендуют также антибиотикотерапию.

ВОЗБУДИТЕЛЬ МЕЛИОИДОЗА (ЛОЖНОГО САПА)

Мелиоидоз — сапоподобное заболевание, преимущественно септикопиемического характера. Возбудитель мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* — был открыт А. Уайтмором и К. Кришнасвами в 1911 г. в Рангуне, включен в семейство *Burkholderiaceae*, род *Burkholderia*. В естественных условиях им болеют грызуны. К нему восприимчивы лошади, обезьяны, собаки, мелкий рогатый скот, а также человек.

Морфология. Короткие палочки размером 0,8–1,5 мкм, подвижные (лофотрихи), грамтрицательные, располагаются одиночно или в виде коротких цепочек. Спор и капсул не образуют.

Культивирование. Бактерия растет на обычных питательных средах при pH 6,8–7,2. Оптимальная температура — 37°C. На МПА образуются вначале гладкие колонии, затем они становятся шероховатыми и плоскими, через 4–7 сут. появляется желтовато-коричневый пигмент. На картофельной среде — обильный налет кремового цвета.

Культуры ферментируют с образованием кислоты лактозу, глюкозу, мальтозу, маннит и дульцит. Желатин разжижают, сероводород образуют, индол не образуют.

Устойчивость. В почве и воде бактерия сохраняется до 40 сут., в моче — 17, в трупах грызунов — 8 сут., быстро погибает при кипячении; 1%-ный раствор фенола и 0,1%-ный раствор формалина убивают ее в течение 24 ч.

Патогенность. Основной фактор патогенности — эндотоксин; свежeweделенные штаммы образуют гемолизин, а продукты гидролиза возбудителя обуславливают ГЗТ.

Лабораторная диагностика основана на исследовании патматериала с целью выделения чистой культуры возбудителя болезни. На различных этапах бактериологического исследования используют РИФ, РНГА и ИФА. Для серологической

диагностики мелиоидоза применяют пробирочную РА, РСК и РПГА.

Иммунитет при мелиоидозе изучен слабо. В крови больных животных обнаруживают комплементсвязывающие и агглютинирующие антитела. Средства специфической профилактики отсутствуют.

2.13. ВОЗБУДИТЕЛЬ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Кампилобактериоз — инфекционная болезнь крупного рогатого скота, овец, свиней, домашних и диких птиц, комнатных животных (собак, кошек и др.). У млекопитающих отмечают аборт, временное бесплодие, задержание последа, метриты, рождение нежизнеспособного молодняка, тяжелые кишечные заболевания; у кур — снижение прироста массы бройлеров, яйценоскости кур-несушек и падеж цыплят. Эта болезнь регистрируется во всех странах мира.

Впервые возбудитель был выделен в 1909 г. в Англии от абортировавшей овцы, а в 1913 г. от абортировавшей коровы. Болезнь была названа вибриозом Смит и Тейлор (1919), а возбудитель вначале получил название *Vibrio fetus*. В России кампилобактериоз (вibriоз) впервые установил В. Л. Якимов в 1926 г., а позднее Е. В. Козловский в 1938 г.

От людей кампилобактерии были выделены в 1947 г. Винзентом и др. Позднее многими исследователями было установлено, что отдельные виды кампилобактерий (*C. jejuni*, реже *C. coli*, *C. laridis*) могут вызвать у человека тяжелые диарейные и другие заболевания.

Кампилобактеры отнесены к семейству *Spirillaceae* и выделены в род *Campylobacter*. Выделено и описано 15 видов и подвидов кампилобактерии (от *греч.* *kampylos* — изогнутый, *bakterion* — палочка), но не все они патогенны для животных и человека.

Морфология. Кампилобактеры — полиморфные, тонкие, изогнутые палочки в виде запятой, летящей чайки, буквы V; в виде спирали с одним или несколькими завитками; длиной 0,5–8 мкм и толщиной 0,2–0,5 мкм. Подвижные, имеют один или два полярно расположенных жгутика (до 15 мкм); движение винтообразное. Капсул и спор не образуют.

Грамотрицательные, спиртово-водные растворы анилиновых красителей воспринимают с трудом; окрашиваются разведенным 1:5 карболовым фуксином Циля.

Культивирование. Бактерии относятся к микроаэрофилам, хотя отдельные штаммы могут расти и в анаэробных условиях. Для получения культуры возбудителя используют полужидкий мясо-печеночный агар (МППА), сафранино-железеновобиоциновую среду (СЖН).

В пробирках с ПЖА на 2–7 сут. появляется рост в виде тонкого серого диска около самой поверхности среды; на плотной среде кампилобактеры образуют отдельные серо-голубоватые колонии; на СЖН при росте чистой культуры розовый цвет среды не изменяется.

Биохимические свойства. Кампилобактеры не ферментируют углеводы и мочевины; дезаминируют глутаминовую и аспарагиновую кислоты; оксидазоположительны; индол не выделяют. Образуют сероводород, за исключением подвида *C. fetus venerealis*. Желатин не разжижают, молоко не свертывают, не вызывают гемолиза на средах с кровью. Кампилобактерии имеют О-, Н- и К-антиген, белковой и полисахаридной природы, термостабильные и термолабильные энтеротоксины.

Устойчивость. В сене, навозе, почве, воде кампилобактеры остаются жизнеспособными до 1 мес., в гниющем материале разрушаются быстро. К замораживанию устойчивы: в инфицированных тканях матки и плодов при температуре -20°C сохраняются 5–8 мес. Высушивание их убивает через 3 ч, при 55°C гибнут в течение 10 мин.

Растворы едких щелочей, хлорной извести, свежегашеной извести в концентрациях, применяемых для дезинфекции, убивают их за 5–10 мин.

Патогенность. В естественных условиях кампилобактериозом болеют домашние и дикие животные. Основной возбудитель данной бактерии крупного рогатого скота — подвид *C. venerealis*, овец — *C. fetus*. Заболевания свиней могут обусловить подвиды *C. venerealis* и *C. mucosalis*. У кур чаще всего обнаруживают патогенные *C. jejuni*.

У человека болезнь протекает как острое желудочно-кишечное заболевание, вызывает штамм *C. jejuni*. Установлено, что

патогенность *C. jejuni* связана с действием эндотоксина, термолabileного и термостабильного энтеротоксинов.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют абортированный плод с оболочками, часть плаценты: от коров — слизь из шейки матки; от быков — препуциальную слизь, сперму; от убитых с диагностической целью животных — матку, яичники, влагалище; при поражении желудочно-кишечного тракта — содержимое слепой кишки и тонкого отдела кишечника.

Лабораторные методы диагностики кампилобактериоза включают микроскопию, получение культур и их видовую идентификацию, при необходимости — серологическую типизацию выделенных культур.

Микроскопия. Мазки окрашивают по Граму разведенным 1:5 фуксином Циля 1–2 мин. При положительном результате в препаратах обнаруживают типичные по морфологии кампилобактеры.

Выделение культур. Исследуемый материал высевают в чашки с ПЖА, СЖН или другие селективные среды (лучше сеять одновременно на две среды). Чашки помещают в микроанаэростат с 10–15% CO₂, инкубируют при 42°C в течение 2–3 сут., просматривая их каждый день.

Дифференциацию *C. fetus* и *C. sputorum*, выделенных от животных, проводят по культуральным, биохимическим и серологическим свойствам возбудителя.

Серологическую идентификацию культур осуществляют со стандартными моноспецифическими сыворотками, ориентировочно в пластинчатой РА и окончательно в пробирочной РА.

Для обнаружения и идентификации возбудителей кампилобактериоза в культурах и патологическом материале применяется также прямой метод реакции иммунофлюоресценции с люминесцирующими сыворотками.

Серологическое исследование. Серологическая диагностика кампилобактериоза у коров проводится при помощи реакции агглютинации с вагинальной слизью (РАВС), а у овец — РА с сывороткой крови.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие кампилобактериозом животные приобретают стойкий иммунитет, повторные аборт не наблюдают. Иммунитет

гуморальный: в сыворотке крови выявляются специфические антитела.

Для активной профилактики применяют эмульсинвакцины против кампилобактериоза крупного рогатого скота и овец, а также ассоциированные вакцины против кампилобактериоза, лептоспироза, сальмонеллеза и других инфекций.

2.14. ВОЗБУДИТЕЛИ ЛЕПТОСПИРОЗА, ЛИСТЕРИОЗА И РОЖИ СВИНЕЙ

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспиры вызывают лептоспироз — инфекционную природно-очаговую болезнь животных и человека, характеризующуюся кратковременной лихорадкой, анемией, желтухой, гемоглобинурией, геморрагическим диатезом, некрозом слизистых оболочек и кожи, атонией органов пищеварения, абортами. Болезнь может протекать бессимптомно. Возбудитель был открыт Инад и Идо в 1914–1915 гг.

Лептоспиры относятся к семейству *Leptospiraceae* (*leptos* — тонкий, *spira* — виток, спираль) и роду *Leptospira*, который включает два вида: патогенный — *L. interrogans* и сапрофитический — *L. viflexa*. Патогенный вид представлен 183 сероварами, которые по составу антигенов объединены в 25 серогрупп.

В инфекционной патологии животных наибольшее значение имеют серогруппы: *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*.

Морфология. Лептоспиры — спиралевидные бактерии диаметром 0,1–0,25 и длиной 6–30 мкм, образующие около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков и 1–2 вторичных, придающих клетке форму букв G, S, C. В темном поле они имеют вид тонких серебристых нитей с утолщенными и загнутыми в виде крючков концами. У клеток некоторых штаммов концы прямые (бескрючковые лептоспиры).

Для лептоспир характерна активная подвижность. Главный тип движения — вращательно-поступательный. Спор не образуют. Грамотрицательны, плохо окрашиваются анилиновыми красителями; по Романовскому — Гимза окрашиваются в красный

цвет, но фиксация резко изменяет их морфологию; используется также метод импрегнации серебром по Левадиту.

Культивирование проводят в аэробных условиях при температуре 28–30°C на специальных средах, содержащих 5–10% сыворотки крови кролика или овцы, дистиллированную, водопроводную воду или фосфатный буфер (рН 7,2–7,6). К ним относятся следующие среды: Уленгута, Терских, Ферворта — Вольфа, Любашенко и др. Размножение лептоспир обычно начинается через 7–20 дней, иногда 1–2 мес. Внешне среда при этом не изменяется, и появление роста контролируют микроскопией препарата «раздавленная капля» в темном поле. На плотных средах (Кокса, ВГНКИ) лептоспиры образуют колонии S-, O- и R-форм. S-форма колоний — типичная для вирулентных штаммов, ее колонии прозрачные, в виде диска с ровным краем.

Биохимические свойства изучены недостаточно. Ферментация углеводов не доказана; были обнаружены каталаза, оксидаза, липаза и др.

Устойчивость. В воде открытых водоемов патогенные лептоспиры сохраняются от 7 до 30 дней и более. Будучи типичными гидрофилами, в почве, перенасыщенной водой, выживают до 280 дней, в свежем молоке — 8–24 ч; в замороженном мясе погибают через 10 дней. Чувствительны к воздействию поваренной соли; в засоленном (4,8% NaCl) мясе крупного рогатого скота погибают через 10 дней; в гипертоническом растворе поваренной соли (2,8%) — через 15 мин.

При кипячении погибают моментально, при 56–58°C — в течение 25–30 мин. Быстро гибнут при высушивании и под воздействием прямого солнечного света. 0,1%-ный раствор соляной кислоты, 0,5%-ный раствор фенола инактивируют лептоспиры за 20 мин.

Патогенность. К лептоспирозу наиболее восприимчивы крупный рогатый скот (серогруппы помона и гебдомадис), свиньи (серогруппы помона и тарассови), лисицы, песцы; менее восприимчивы лошади, козы, овцы, буйволы, верблюды, олени, ослы, собаки, кошки, куры. Лептоспирозом болеет и человек. Основными носителями данного заболевания в природных очагах являются серые и водяные полевки, серые крысы, домовые мыши и землеройки.

К экспериментальному заражению наиболее чувствительны золотистые хомячки, крольчата-сосуны и молодые морские свинки.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат: кровь (лучше брать на 3–5-й день болезни при повышенной температуре тела), моча, кусочки паренхиматозных органов, почка, мочевого пузыря с содержимым, абортирванный плод. Патологический материал отбирается не позже 2 ч после гибели животного. Моча собирается при естественном мочеиспускании и в летнее время исследуется в течение 3 ч.

Микроскопия. Исследуют мочу, цитратную кровь, тканевую суспензию. Микроскопию проводят в раздавленной капле с конденсором «темного поля». Типичные лептоспиры подвижны и имеют форму прямой или S-образно изогнутой серебристо-белой нити с загнутыми в виде крючков концами. Лептоспиры также можно обнаружить в срезах из органов после импрегнации серебром по методу Левадити.

Выделение культур. Материал засевают по 1–3 капли одновременно в 3–5 пробирок со специальной питательной средой, инкубируют при температуре 28–30°C в течение 3 мес. Лептоспиры начинают размножаться через 7–20 дней, иногда через 1–2 мес., очень редко — через 3 мес. Получить культуры лептоспир удается не всегда.

Биологическая проба. Метод более эффективный, чем бактериологический; проводится с целью выделения и очистки культур лептоспир, определения вирулентности и дифференциации от сапрофитов.

Серологическое исследование. Для серологической диагностики лептоспироза используют РМА (реакция микроагглютинации) и реакцию агглютинации (РА). Пробы крови берут на 5–7-й день болезни и при исследовании отдельных животных повторно через 7–10 дней. Необходимо помнить, что антитела в крови у выздоровевших животных могут сохраняться до двух и более лет.

Лептоспиры можно идентифицировать на уровне вида, серогруппы и серовара при помощи ПЦР.

Иммунитет и средства специфической профилактики. После переболевания у животных формируется длительный и напряженный иммунитет.

Для активной иммунизации применяют депонированную по-
ливалентную вакцину ВГНКИ против лептоспироза животных.

Для пассивной иммунизации и лечения больных животных
используют гипериммунную сыворотку против лептоспироза.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА

Возбудителем листериоза является *Listeria monocytogenes*,
который вызывает болезнь у животных многих видов и челове-
ка. Заболевание характеризуется септическими явлениями,
поражением центральной нервной системы и мочеполового ап-
парата.

Морфология. *L. monocytogenes* — полиморфная палочка с
закругленными концами длиной 0,5–3,0 мкм и шириной 0,3–
0,5 мкм; подвижная, грамположительная. В мазках палочки
располагаются поодиночке или под углом в виде римской циф-
ры V. Спор и капсул не образуют.

Культивирование. Листерии — факультативные аэробы.
Оптимум температурного роста на питательных средах с pH 7,2–
7,4 составляет 36–38°C, однако они могут расти при температу-
ре от 4 до 45°C, что используют при дифференциации. На МПА
образуют мелкие росинчатые колонии. В МПБ вызывают незна-
чительное помутнение среды с образованием слизистого осад-
ка. Листерии хорошо растут на печеночных средах с добавле-
нием 1% глюкозы и 2–3% глицерина. В качестве элективных
сред используют МПБ с 0,05% теллурита калия или 0,01–0,02%
теллурита калия в водном растворе глицерина и растворе поли-
миксина. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона
гемолиза.

Биохимические свойства. Листерии ферментируют с обра-
зованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, рамнозу и сали-
цин; замедленно — сахарозу, крахмал и глицерин; некоторые
культуры разлагают лактозу и мальтозу. Не ферментируют ара-
бинозу, дульцит, инулин и сорбит; не образуют индол и серово-
дород; не разжижают желатин; не восстанавливают нитраты в
нитриты; дают положительную пробу на каталазу.

Устойчивость. Листерии устойчивы во внешней среде.
В почве они сохраняют жизнеспособность от 6 до 11 мес.; в
воде — в течение года и более; в навозе — до 7 мес., в сило-
се — более года; в мясе — до года. В бульонных культурах лис-

терии погибают при 100°C через 10–15 мин, при 55°C — через 1 ч; 2,5% -ный раствор формальдегида обезвреживает их через 20 мин, а 2,5% -ный раствор гидроксид натрия и раствор хлорной извести с содержанием 2% активного хлора — через 20 мин.

Патогенность. Листерии патогенны для многих видов млекопитающих, в том числе грызунов, хищных и копытных, а также для птиц. Из домашних животных листериоз зарегистрирован у мелкого и крупного рогатого скота, лошадей, кроликов, кур, уток и др. Листериезом болеет также человек, заражение происходит при контакте с больными животными, при употреблении продуктов, приготовленных из мяса больных животных, чаще болеют работники животноводства (свинарки, доярки). Бактерии проникают в организм человека через поврежденные слизистые, кожу и желудочно-кишечный тракт.

Патогенез. В зависимости от места внедрения возбудитель распространяется в организме различными путями: гематогенным, лимфогенным и нейрогенным. У беременных животных листерии вызывают гибель плодов. Патогенное действие листерии обуславливается за счет выделения экзо- и эндотоксинов.

Бактериологическая диагностика. Диагноз ставят на основании выделения культуры листерий из патологического материала. Для исследования в лабораторию направляют тушки мелких животных или голову (головной мозг), паренхиматозные органы, абортирванный плод и его оболочку. Для прижизненной диагностики направляют кровь или сыворотку крови, а также истечения из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени.

Для *микроскопического исследования* из патологического материала готовят мазки-отпечатки, применяют окраску по Граму и метод флюоресцирующих антител.

Для *бактериологического исследования* из паренхиматозных органов и головного мозга делают обильные посевы на селективные среды, а также на кровяной агар. Рекомендуется часть материала сохранять в холодильнике в течение 30 сут. для проведения повторных исследований при отрицательном результате первичного посева.

Посевы инкубируют в термостате при 37°C, ежедневно просматривая в первые 3–4 дня, при отсутствии роста наблюдение продолжают до 2 нед.

Выделенные культуры исследуют на подвижность, изучают их ферментативные свойства на средах Гисса, ставят пробу на каталазу. Проводят дифференциацию от возбудителя рожи свиней, делая высев на среду с метилротом или нейтральротом в смеси с метиленовым синим: листерии обесцвечивают среды, а возбудитель рожи свиней — нет. Ставят капельную РА на стекле с поливалентной и серогрупповой листериозной агглютинирующей сывороткой.

Биологическая проба. Наиболее чувствительны к данному заболеванию белые мыши и кролики. Заражают внутрибрюшинно или внутривенно в дозе 0,3–0,5 мл суточной бульонной культуры.

Специфические свойства листерий проверяют также с помощью конъюнктивальной пробы на морских свинках или кожной пробы на морских свинках или кроликах.

Конъюнктивальная проба. На конъюнктиву глаза морской свинки наносят две капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном. На 2–4 сут. вирулентные листерии вызывают гнойный кератоконъюнктивит. При положительной кожной пробе через 48 ч развивается воспаление с последующим некрозом участка кожи и образованием струпа. Для типирования культур используют также листериозные бактериофаги.

Серологическая диагностика. Сыворотку животных исследуют в РА и РСК. РА признается положительной при наличии агглютинации с оценкой не менее чем на два креста в разведениях сыворотки 1:200 для овец, коз и свиней, для лошадей и крупного рогатого скота — 1:400, для кроликов — 1:50.

Для диагностики листериоза с помощью РНГА используют диагностикум Омского НИИ природно-очаговых болезней.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают иммунитет. С профилактической целью применяют сухую живую вакцину из штамма АУФ. После однократного ее введения у крупного рогатого скота, свиней и овец создается иммунитет продолжительностью до года, у кроликов и норок — до 6 мес.

**Дифференциальные признаки возбудителей
лиστεриоза и рожи свиней**

№	Свойства возбудителя	Возбудитель листериоза	Возбудитель рожи свиней
1	Подвижность	Подвижны	Неподвижны
2	Проба на каталазу	Положительная	Отрицательная
3	Салицин	Разлагает	Не разлагает
4	Индикаторные среды	Обесцвечивает	Не обесцвечивает
5	РА с позитивной листериозной сывороткой	Положительная	Отрицательная
6	Конъюнктивная проба на морских свинках	Положительная	Отрицательная

Дифференциальные признаки, по которым проводят идентификацию возбудителей рожи свиней и листериоза, представлены в табл. 2.

Листерии чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда (окситетрациклин, хлортетрациклин), ампициллину.

**ВОЗБУДИТЕЛЬ
РОЖИ СВИНЕЙ**

Возбудитель рожи свиней — бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вызывает инфекционную болезнь, характеризующуюся при остром течении септициемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом — эндокардитом и артритами. Им болеют животные преимущественно в возрасте 3–12 мес.

Морфология. Возбудитель — тонкая прямая или слегка изогнутая мелкая палочка размером 1,5–2×0,2–0,3 мкм, но в старых культурах и патматериале обнаруживают и нитевидные формы. Бактерии неподвижны. Споры и капсулу не образуют. Грамположительные, хорошо окрашиваются обычными анилиновыми красителями.

Культивирование. Растет в аэробных и анаэробных условиях, лучше в атмосфере с пониженным давлением кислорода, содержащей 5–10% CO₂ (микроаэрофил). Возбудитель рожи культивируют в МПБ, на МПА, МПЖ, бульоне Хоттингера, элективной среде Сент-Иваньи (агаровая среда с 0,1% кристаллвиолета

и 1% азида натрия). Оптимальные условия для роста: температура 36–37°C, рН 7,2–7,6. МПБ не мутнеет, и только при встряхивании пробирки появляются муаровые волны. Через 48–72 ч на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании поднимается в виде облачка.

На МПА возбудитель растет в виде мелких росинчатых колоний (S-форма), видимых только под определенным углом освещения. S-формы выделяют при остром течении болезни; при хроническом могут появиться колонии R-формы — крупные, с неровной шероховатой поверхностью и отходящими от края корнеобразными отростками.

В столбике желатина при посеве уколом через 6–10 сут. от серовато-белого стержня отходят горизонтальные нежные отростки, желатин не разжижается.

Биохимические свойства. Бактерии рожи свиней выделяют сероводород, не образуют индол и каталазу; большинство штаммов разлагают с образованием кислоты без газа лактозу, глюкозу, галактозу, левулезу; редко — ксилозу, арабинозу, мальтозу и рамнозу; не ферментируют сахарозу, маннит и салицин.

Устойчивость. Возбудитель обладает высокой устойчивостью во внешней среде. В трупах животных может сохраняться, а иногда и размножаться в течение 3–4 мес. В почвах, богатых органическими веществами, сохраняется 7–8 мес., в навозной жиже — до 20 сут., в речной воде при 4°C — 75–86, в моче свиней — 113–145, в фекалиях — 38–75 сут. В засоленной свинине бактерии выживают до 6 мес., в копченых продуктах — до 3 мес. Прямые солнечные лучи убивают через 10–12 сут., высушивание при рассеянном свете — через 3–4 нед.; нагревание при 50°C — через 15 мин, при 70°C — через 5 мин.

Возбудитель рожи свиней чувствителен к антибиотикам и дезинфектантам. Особенно эффективны 2–3%-ные растворы гидроксида натрия, 20%-ная взвесь свежегашеной извести, 2%-ный раствор формальдегида, 5%-ный горячий раствор кальцинированной соды.

Патогенность. Восприимчивы к бактериям свиньи, особенно в возрасте от 3 мес. до 1 года. Спорадические случаи болезни отмечены у лошадей, крупного рогатого скота, овец, оленей, собак. Возбудитель рожи свиней патогенен и для человека. Восприимчивы дельфины, многие виды грызунов и насекомыхяд-

ных, утки и гуси, а также куры и индейки. Бактерии можно обнаружить на поверхности тела, в кишечнике и даже мышцах некоторых видов морских и пресноводных рыб, для которых они не патогенны.

К экспериментальному заражению восприимчивы белые мыши и голуби, они гибнут через 2–5 сут. Менее чувствительны кролики, которые после внутривенного заражения гибнут на 3–6 сут.

Лабораторная диагностика. Для исследования в лабораторию направляют труп животного целиком или сердце, печень, селезенку, почку и трубчатую кость. При подозрении на хроническое течение — обязательно сердце. Выявление возбудителя рожи проводят с использованием микроскопического, бактериологического и серологического (РА, РИФ) методов.

Микроскопия. Мазки-отпечатки из органов окрашивают по Граму. В положительных случаях в мазках обнаруживают грамположительные палочки, расположенные одиночно, попарно или скоплениями, при хроническом течении появляются длинные нити.

Посев на питательные среды. Высевы делают из крови сердца с пораженными клапанами, почки, селезенки, печени, костного мозга в МПБ или бульон Хоттингера и на МПА. Посевы инкубируют при 36–37°C в течение 18–24 ч, а при отсутствии роста еще сутки. Выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, а также в РА на предметном стекле с диагностической противорожистой сывороткой. В положительном случае агглютинация наступает быстро, агглютинат имеет вид плотных мелких комочков.

К возбудителю рожи относят культуру, выделяющую сероводород, не образующую каталазу, разлагающую глюкозу, лактозу (без газа) и не ферментирующую сахарозу и маннит, дающую положительную РА со специфической сывороткой.

Для обнаружения рожистых бактерий в патологическом материале, а также идентификации выделенных культур используют *метод флуоресцирующих антител*.

Биологическая проба. Белых мышей или голубей заражают суспензией (1:10) из органов или бульонной культурой; мышей заражают подкожно (0,1–0,2 мл), голубей — внутримышечно

(0,2–0,3 мл). Мыши и голуби погибают на 2–4 сут. Из органов павших животных делают посев в МПБ и на МПА для выделения чистой культуры возбудителя.

Дифференциальный диагноз. Бактерию рожи свиней необходимо дифференцировать от возбудителя листериоза, а также возбудителя мышьяной септицемии (*Bac. murisepticum*), который непатогенен для голубей, ферментирует сахарозу, не дает РА со специфической рожистой сывороткой.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие свиньи приобретают стойкий и длительный иммунитет.

В настоящее время у нас в стране применяют концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину и вакцину против рожи свиней из штамма ВР-2. Поствакцинальный активный иммунитет продолжается в среднем 4–6 мес., пассивный — до 2 нед.

Для пассивной профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Положительный эффект при лечении оказывают антибиотики (пенициллин, стрептомицин, окситетрациклин, эритромицин и др.), особенно в сочетании с противорожистой гипериммунной сывороткой.

2.15. ВОЗБУДИТЕЛЬ КОНТАГИОЗНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Возбудитель болезни — *M. mycoides subsp. mycoides*. Контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота характеризуется экссудативным поражением легких с выраженным серозным воспалением междольчатых перегородок, серознофибринозным плевритом, скоплением в грудной полости большого количества экссудата и образованием инкапсулированных очагов в легких, где длительное время обитает возбудитель.

Морфология. Микроорганизм имеет форму кокков, диплококков, колец, нитей, звезд, дисков или гроздевидных образований. Нитевидные структуры достигают длины 125–240 мкм, отдельные овальные формы имеют размеры 0,2–0,8 мкм. Особенно полиморфизм выражен в бульонных культурах. возбу-

дитель микоплазмоза проходит через бактериальные фильтры. В препаратах из чистой культуры микоплазмы хорошо окрашиваются по Романовскому — Гимза, а также карболовым раствором анилиновых красителей.

Культивирование. Для выделения культур чаще всего используют мартеновский бульон с 10–15% сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади, добавление 10% свежего дрожжевого экстракта стимулирует рост. В бульоне рост проявляется на 2–3 сут. в виде опалесценции различной интенсивности или муаровых волн при встряхивании. На агаре возбудитель микоплазмоза растет в виде характерных колоний, напоминающих яичницу-глазунью, центр колонии — оптически более плотный, вырастает в толщу среды. На кровяном агаре формирует зону α -гемолиза, а также глюкозу, мальтозу, маннозу, крахмал, образует сероводород.

Устойчивость. В окружающей среде устойчивость микоплазм незначительная. Высушивание и действие солнечных лучей на пастбище уничтожают микроб через 5–24 ч; в экссудате из грудной полости при 4–8°C он сохраняет вирулентность до 8 сут.; нагревание до 58°C убивает его в течение часа, в бульонных культурах при 37°C гибнет через 3 нед. В замороженных легких и лимфе возбудитель может сохраняться от нескольких месяцев до года, в лиофилизированных бульонных культурах и экссудате — более 5 лет.

Гидроксид натрия, хлорная и свежегашеная известь, формалин в обычных концентрациях убивают микоплазмы через 3–4 ч.

Патогенность. Возбудитель микоплазмоза обладает выраженной патогенностью для крупного рогатого скота и близких ему видов — буйволов, бизонов, зебу, яков. Естественное заражение происходит через дыхательные пути при вдыхании капелек или пылинок с возбудителем, выделяемым больными со слизью из респираторных органов и с мочой.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая диагностика основана на выделении культуры микоплазм из плеврального экссудата на специальных сывороточных средах. При первичном возникновении болезни в благополучном хозяйстве рекомендуется ставить биологическую пробу на 2–3-х здоровых телятах 6–8-месячного возраста. Им вводят подкожно

в области подгрудка, интратрахеально или интраплеврально экссудат от больных животных или культуру и ведут наблюдение до 30 сут.

В *серодиагностике* используют РСК как метод прижизненного выявления больных и инкубатилов в стаде. В комплексе с другими методами исследования эта реакция имеет исключительное значение в диагностике.

В качестве диагностического теста испытана реакция непрямой гемагглютинации, чувствительность которой с сыворотками, взятыми в острой фазе болезни, выше, чем РСК. Напротив, с сыворотками крови хронически больных она по чувствительности уступает РСК.

Положительные результаты получены также при испытании реакций иммунодиффузии в геле и иммунофлюоресценции. Предложена кожная аллергическая проба.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Животные, переболевшие контагиозной перипневмонией, приобретают длительный иммунитет, хотя его продолжительность точно не установлена.

В настоящее время в странах, где встречается болезнь, животных прививают живыми культуральными вакцинами из специально селекционированных штаммов. Наиболее широкое распространение получила вакцина из восточноафриканского штамма Т₁. Вакцину вводят в кончик хвоста в дозе 0,5 мл или подкожно в области шеи в дозе 1 мл. Она создает достаточно напряженный иммунитет (до года) и не вызывает поствакцинальных осложнений.

2.16. ВОЗБУДИТЕЛЬ РИККЕТСИОЗА (КУ-ЛИХОРАДКА)

Ку-риккетсиоз (от *англ.* *queu* — неясный, неопределенный) вызывают *Coxiella burneti*, характеризуется развитием ринита, пневмонии, конъюнктивитами и абортами. Болеет крупный и мелкий рогатый скот. Другие виды животных, в том числе птицы, могут быть риккетсионосителями.

Морфология и тинкториальные свойства. Риккетсии Бернета — полиморфные микроорганизмы, преобладают кокковидные и палочковидные формы шириной 0,2–0,4 мкм и дли-

ной 0,4–1,0 мкм. Выявлены две фазы их существования, аналогичные гладким и шероховатым формам бактерий: фаза I — естественная форма существования микроорганизма, фаза II — форма существования при пассировании на куриных эмбрионах. Эти фазы различаются по морфологическим, патогенным, антигенным и другим свойствам. Микробы обеих фаз грамотрицательные, но при некоторых условиях окрашиваются по Граму положительно, не имеют жгутиков. Размножаются бинарным делением.

Культивирование. Хорошо культивируются риккетсии в желточных мешках куриных эмбрионов, культурах клеток (фибриобласты, L-клетки и др.), органах и тканях лабораторных животных (морские свинки, хомяки, белые мыши, кролики).

Устойчивость. В высохшей крови, взятой от больных животных, сохраняются 180 сут., в сухих фекалиях клещей — 586, в молоке при 4°C — от 40 до 150 сут., в моче и навозе — несколько недель.

Патогенность. Восприимчивы 70 видов млекопитающих, 50 видов птиц и более 40 видов кровососущих членистоногих (клещи, вши, блохи). Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствителен крупный и мелкий рогатый скот, у которого риккетсии могут вызывать остро и хронически протекающие болезни.

Лабораторная диагностика включает в себя:

- выявление специфических антител в сыворотке крови подозреваемых на Ку-лихорадку животных в РДСК, проводят также РА и РИФ;
- обнаружение возбудителя в патологическом материале путем постановки биологической пробы.

Для лабораторного исследования используют материал, взятый прижизненно, — кровь, клещи, собранные с животных, выделения из матки и влагалища, плаценту abortировавшего животного, а от погибших и убитых с диагностической целью животных — кусочки пораженного легкого, головного мозга, селезенки, регионарные лимфатические узлы.

Для выделения возбудителя из исследуемого материала готовят суспензию в физиологическом растворе (1:10), в которую добавляют пенициллин (1000 ЕД/мл) и стрептомицин

(500 ЕД/мл). Затем через 2–3 ч проверяют ее на стерильность путем высева на сахарный МПА и в МПБ, среду Сабуро и используют для биопробы, которую проводят на морских свинках массой 300–400 г, на белых мышах массой 8–10 г или на 6–7-суточных куриных эмбрионах. На 2–3 сут. после повышения температуры проводят диагностический убой. У вскрытых животных наблюдают признаки пневмонии, дегенеративные изменения печени, на селезенке фибринозный налет. Из паренхиматозных органов готовят мазки-отпечатки для микроскопии.

Разработаны различные методы окрашивания мазков-отпечатков для обнаружения возбудителя Ку-лихорадки. Наиболее результативно окрашивание производится следующим методом: высушенные на воздухе мазки фиксируют и окрашивают основным фуксином Циля (15 капель фуксина на 10 мл воды) в течение 5 мин, фуксин смывают водой, препарат погружают на 2–3 с в 0,5% -ный раствор лимонной кислоты и промывают водой. Затем в течение 15–30 с докрашивают 0,5% -ным водным раствором метиленовой сини и промывают водой; высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Риккетсии имеют вид палочек или кокков красного цвета на синем фоне.

Серологическая диагностика. Антитела улавливаются в серологических реакциях через 2–3 нед. после заражения. Для этого используют РСК, РДСК, Elisa, РА.

В соответствии с «Методическими указаниями по серологической диагностике Ку-лихорадки животных» (1996) в РФ используют реакцию длительного связывания комплемента, ИФА, РСК.

Иммунитет изучен недостаточно. В организме зараженного животного (коровы, овцы и др.) отмечено длительное (свыше двух лет) сохранение возбудителя. В этот период возможна ре- и суперинфекция.

У людей, переболевших Ку-лихорадкой, развивается относительно стойкий иммунитет.

Биопрепараты. Средства специфической профилактики отсутствуют. Больных животных лечат антибиотиками тетрациклинового ряда. В медицинской практике используют вакцину из штамма М-44 возбудителя II фазы Ку-лихорадки.

2.17. ВОЗБУДИТЕЛЬ ХЛАМИДИОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Хламидии принадлежат к семейству *Chlamydiaceae* и роду *Chlamydia*, который включает более 30 возбудителей. На основании морфологических и биохимических отличий хламидии разделены на два вида: *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia psittaci*.

Патогенные хламидии вызывают разнообразные по патогенезу и симптомам болезни — пневмонии, аборт, энтериты, менингоэнцефалиты, полиартриты, конъюнктивиты.

Chlamydia psittaci вызывает патологию у многих видов животных. Данное заболевание свойственно и человеку. Наиболее значимы орнитоз и хламидийные аборт сельскохозяйственных животных.

Морфология и биологические свойства. Морфология хламидий своеобразна. Инфекционные формы — округлые элементарные тельца величиной 200–400 нм. Они неподвижные, грамотрицательные. При окрашивании по Маккиавелло приобретают преимущественно красный цвет, по Романовскому — Гимза — красно-фиолетовый (это зависит от стадии их развития). Под обычным световым микроскопом имеют вид точечных образований.

Элементарные тельца имеют двухслойную оболочку, электронно-плотную цитоплазму (нуклеоид) в центре, окруженную более светлым периферическим слоем, в состав рибосом входят ДНК и РНК.

Культивирование. Хламидии являются строгими внутриклеточными паразитами. Их культивируют в желточных мешках куриных эмбрионов, культурах диплоидных и перевиваемых клеток. Размножение возбудителя происходит быстро и эффективно. Элементарные тельца, попавшие в цитоплазменные вакуоли клетки, превращаются в крупные ретикулярные (сетчатые) формы, которые растут и размножаются путем бинарного деления.

Устойчивость изучена мало. Предполагают, что вне организма животных возбудители активны лишь несколько дней. В воде при комнатной температуре сохраняют инфекционность 2–3 сут. Легко инактивируются при высоких и очень низких значениях pH. В лабораторных условиях сохраняются месяцами, а в высушенном состоянии — годами.

Патогенность. Хламидии вида *Ch. psittaci* патогенны для всех основных видов сельскохозяйственных животных, а также для человека. Из лабораторных животных наиболее чувствительны белые мыши и морские свинки.

Патогенез. Заражение животных происходит в результате проникновения возбудителя алиментарным путем, со спермой, от больной матери плоду и новорожденным. Возможен аэрогенный путь заражения.

Проникая в кровь больных животных, хламидии могут быть причиной пневмонии, энтеритов и полиартритов. Отмечают истощение животных, снижение молочной продуктивности, метриты, вагиниты и бесплодие. У самцов развиваются уретриты, эпидимиты и импотенция.

Лабораторная диагностика. Хламидиозы, в том числе хламидийные аборт, сельскохозяйственных животных диагностируют в основном серологическим методом. Для выделения возбудителей хламидийного аборта используют абортированный плод или его паренхиматозные органы и желудок, экссудат из брюшной полости, котиледоны, выделения из шейки матки и влагалища абортировавшего животного.

При диагностике хламидийного аборта крупного рогатого скота суспензией патологического материала заражают естественно-восприимчивых животных: морских свинок, белых мышей и иногда суточных цыплят. У морских свинок при подкожном или внутрибрюшинном заражении (по 0,4–0,5 мл) через 7–8 сут. повышается температура тела до 40,5°C, болезнь заканчивается летально. При вскрытии обнаруживают некрозы в печени, воспалительные изменения в легких, а также скопление серозного и фибринозного экссудата в брюшной полости. В экссудате обычно находят элементарные тельца возбудителя. Беременные морские свинки, как правило, абортируют через 10–20 сут. после введения материала. Белые мыши чувствительны при разных способах заражения: интраназальном, внутримышечном (по 0,2 мл) и внутрибрюшинном (по 0,5 мл). В результате 60–80% мышей погибает через 6–8 сут. При вскрытии трупов обнаруживают увеличение печени, селезенки, геморрагии в легких, скопление темно-коричневого экссудата в брюшной полости (после внутрибрюшинного введения материала).

Серодиагностику осуществляют с помощью РСК (диагностически достоверен титр 1:10) и РИФ. Ретроспективная диагностика с помощью РСК основана на исследовании парных сывороток крови у абортировавших коров. Кровь берут сразу после аборта и через три недели после него. Обычно наблюдается значительное повышение титра антител (титры их к группоспецифическому антигену достигают от 1:64 до 1:128). Гемагглютинирующие свойства возбудителя определяют в РГА и РЗГА, используя эритроциты белых мышей или кур.

Срок полного лабораторного исследования при диагностике хламидиоза составляет 1,5–2 мес. Предварительный диагноз на основании результатов микроскопического и серологического исследований может быть поставлен через трое суток после поступления патологического материала. При дифференциальной диагностике следует исключить бруцеллез, вибриоз, листериоз, сальмонеллез.

Иммунитет изучен недостаточно. Установлено, что в формировании его участвуют клеточные и гуморальные факторы. При хламидийном аборте в крови, молозиве, молоке коров выявляют комплементсвязывающие и нейтрализующие антитела, гемагглютинины, относящиеся к классам М и G. Однако их максимальные титры в сыворотке крови (1:64–1:128), отмечаемые до 20–24 сут. (у экспериментально зараженных телок), быстро снижались; вторичный подъем титра происходил за 5–7 сут. до аборта или после него. После аборта животные приобретают довольно стойкий иммунитет к реинфекции и могут давать полноценное потомство.

Овцематки в первые 2–3 года после появления хламидиоза в хозяйстве абортируют в 60% случаев, в последующие годы количество абортов снижается до 5%, в дальнейшем окоты у овец проходят нормально. Это свидетельствует о формировании у овец естественного активного иммунитета, обеспечиваемого комплементсвязывающими и нейтрализующими антителами, которые сохраняются у переболевших животных около 1,5 лет.

От взрослых животных (матерей) антитела передаются через молозиво молодняку, формируя у новорожденных телят, ягнят, поросят, жеребят пассивный колостральный иммунитет.

Биопрепараты. Для специфической профилактики хламидийного аборта рогатого скота и свиней испытан ряд экспериментальных вакцин: мертиолат-вакцина, эмульсин-вакцина,

формализированная адсорбат-вакцина, инактивированная с масляным адъювантом вакцина. Однако эти вакцины пока не нашли широкого производственного применения.

Для лечения больных хламидиозом телят используют сыворотку реконвалесценто́в. Получают такую сыворотку от животных-доноров, у которых обнаруживают специфические комплексы связывающие антитела в высоких титрах.

2.18. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ

Возбудители микозов и микотоксикозов. Микроскопические грибы вызывают микозы — специфические болезни различных видов сельскохозяйственных животных, зверей, рыб, пчел, растений и человека. Грибы являются растительными гетеротрофными бесхлорофилловыми организмами, содержащими в клетках истинные ядра.

Возбудителями микозов сельскохозяйственных животных в большинстве случаев служат совершенные грибы из класса фикомицетов (*Phycomycetes*) — муко́ровый гри́б, или головчатая плесень (*Mucor*); пенициллиум, или кистевидная плесень (*Penicillium*); аспергилл, или леечная плесень (*Aspergillus*); дрожжеподобные грибы кандиды из рода *Candida*, возбудители кандидамикоза и эпизоотического лимфангоита (гистоплазмоза), а также возбудители трихофитии из рода *Trichophyton*, микроспории из рода *Microsporum*, фавуса (парши) из рода *Achorion*.

В основе систематики и классификации грибов лежат способы и характер их размножения. Известно около 100 тыс. видов грибов, объединенных более чем в 20 классов, которые, в свою очередь, подразделены на подклассы, порядки, семейства, роды, виды и штаммы.

Микозы известны давно, однако этиология их была установлена только после открытия возбудителей дерматофитозов — фавуса (1839) и микроспории (1843). Позднее были открыты другие возбудители микозов, но до сих пор признанной классификации не существует.

Известны три группы микозов животных, вызываемых патогенными грибами, которые поражают те или иные ткани. *Первая группа* — поверхностные микозы кожи и ее производных (волосы, когти). Возбудитель — грибы из родов *Trichophyton*,

Microsporium и *Achorion*. Вторая группа — глубокие микозы кожи, характеризующиеся появлением узлов в собственной коже и образованием язв по ходу лимфатических сосудов (возбудитель эпизоотического лимфангоита). Третья группа — висцеральные микозы с локализацией процесса в органах дыхания или других органах (возбудители гистоплазмоза, кокцидиоидомикоза, аспергиллеза, мукомикоза).

2.19. ВОЗБУДИТЕЛИ ДЕРМАТОМИКОЗОВ

ВОЗБУДИТЕЛИ ТРИХОФИТИИ

Трихофития (*Trichophytia*) — трихофитоз, стригущий лишай — заразная болезнь, характеризующаяся появлением на коже резко ограниченных безволосых очагов с шелушащейся чешуйчатой поверхностью или с выраженной воспалительной реакцией кожи и фолликулов.

Трихофитию у животных вызывают грибы, относящиеся к роду *Trichophyton*. У крупного рогатого скота трихофитию вызывают *Tr. faviforme* и *Tr. tonsurans*. В нашей стране крупный рогатый скот чаще всего поражает гриб *Tr. verrucosum*.

Возбудитель паразитирует в волосах и на коже в виде разветвленного септированного мицелия, который распадается на споры.

Лошадей поражают грибы *Tr. equi* и *Tr. gypsum*; овец — *Tr. verrucosum var. autotrophicum*, отличающиеся от гриба, поражающего крупный рогатый скот, культурно-морфологическими признаками и динамикой роста на разных питательных средах.

Культивирование. Осуществляют на глюкозном агаре, среде Сабуро или сусле-агаре при pH 6,5–6,8, температуре 26–28°C или комнатной (18–20°C).

Tr. faviforme — медленно растущий гриб. На агаре Сабуро образует кожистые колонии, пуговчатые в центре, с глубинным ростом в питательную среду. На сусло-агаре — колонии желтовато-белые, восковидные, в центре возвышенные, с глубокими складками и плотными лучистыми краями. Иногда колонии кожистые, покрытые белоснежным густым пушком. Гриб формирует мицелий различной толщины и округлые или четырехугольные артроспоры, расположенные цепочками.

Tr. tonsurans (Tr. crateriforme). На агаре Сабуро образует белые или желтые колонии округлой формы; в центре кратерообразные, мучнистые, по периферии бархатистые. В культурах мицелий ветвящийся с многочисленными грушевидными спорами, расположенными гроздевидно на нитях мицелия или на нем непосредственно. В старых культурах встречаются хламидоспоры.

На сусло-агаре колонии мучнистые, по периферии бархатистые, поверхность их складчатая, часто с кратеровидной впадиной в центре. Цвет колоний белый, с возрастом становится кремовым.

Tr. equi. На агаре Сабуро образует колонии в виде белого, реже кремового пушистого налета; с обратной стороны имеют ярко-вишневую окраску.

На сусло-агаре колоний белые, бархатистые, плоские, с возрастом появляются радиальные бороздки. Старые колонии — мучнистые. По бокам гиф формирует хламидоспоры.

Tr. gypsum — быстрорастущий гриб, полиморфный. На сусло-агаре колонии плоские, ровные, приподнятые в центре в виде маленького бугорка, с мучнистой поверхностью белого цвета с переходом в желтоватый, с обратной стороны колонии имеют красную пигментацию.

В культурах мицелий гриба тонкий, разветвленный, с обильными спиральными и кольцевидными окончаниями гиф и многочисленными и гроздевидно расположенными, округлыми спорами.

На среде Сабуро колонии правильной округлой формы, мучнистые, как бы посыпанные порошком гипса. Цвет белый, обратная сторона колоний желтая или коричневая. В центре колоний пуговчатое возвышение.

Tr. verrucosum (var. Autotrophicum). Колонии появляются на сусло-агаре через 20–25 сут. Первичная культура имеет вид белых, тонких и округлых колоний расплывчатой формы, с паутинообразным краем, складчатостью в центре и бархатисто-пушистой поверхностью. Иногда колонии выпуклые, рыхлые или плоские и распростертые, а также округлые, плоские с ровным краем, белые, бархатисто-пушистые, в диаметре от 5–7 до 10–25 мм.

Мицелий септированный, прямой, изогнутый, извилистый, гребешковый, диаметром 3–9 мкм. Содержит единичные арт-

роспоры или распадается на артроспоры 2,5–6 мкм, реже 10–12 мкм в диаметре. Микроконидии округлой, грушевидной, палочкообразной формы, шириной 1,5–2,5 мкм и длиной 5–7 мкм. Макроконидии с обрубленными краями и одной перегородкой, овальной или неправильной формы, размером 3,5×15–25 мкм. Могут встречаться единичные терминальные и интеркалярные хламидоспоры размером 7–13×30 мкм (М. П. Парманов, 1988).

Антигенная структура у дерматофитов неодинаковая. Споры и мицелий трихофитонов содержат полисахаридные и протеиновые антигены.

Устойчивость. Находясь под защитой рогового слоя волоса, возбудители трихофитии сохраняют патогенность до 4–7 лет, а споры — до 9–12 лет. При температуре 60–62°C гриб погибает в течение 2 ч, а при 100°C — за 15–20 мин.

При воздействии щелочного раствора формальдегида в соотношении 1:2 и горячего 10% -ного раствора серно-карболовой смеси при двукратном нанесении грибки погибают в течение 1 ч.

Патогенность. Трихофитий поражает крупный рогатый скот (особенно телят), лошадей, собак, кошек, ослов, свиней, овец, зверей. Из лабораторных животных болеют морские свинки, кролики, мыши, крысы, куры.

У человека трихофитию вызывают *Tr. tonsurans*, *Tr. rubrum*, *Tr. mentagrophytes* и др. Также возможно заражение от животных — *Tr. faviforme*, *Tr. gypseum*, *Tr. verrucosum*.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Животные, переболевшие трихофитией в первый год жизни, повторно не болеют. Зарегистрированы отдельные случаи естественной невосприимчивости животных как к трихофитии, так и к микроспории.

Биопрепараты. Для специфической профилактики трихофитии в неблагополучных хозяйствах используют вакцины ТФ-130 или ЛТФ-130. Телятам их вводят в область крупа двукратно с интервалом 10–14 сут. в дозах 5, 8, 10 мл в зависимости от возраста. Через месяц у них формируется длительный иммунитет (не менее четырех лет).

Больных животных изолируют и лечат с помощью юглона, препарата РОСК, однохлористого йода, фенотиазина, трихотецина; условно здоровых вакцинируют.

ВОЗБУДИТЕЛИ МИКРОСПОРИИ

Микроспория (*Microsporiasis*) — микроспороз, стригущий лишай — заразная болезнь кожи и волос, клинически характеризующаяся образованием очагов поверхностного воспаления кожи, отламыванием волос и поражением ногтей.

Возбудители микроспории — грибы из рода *Microsporum*: *M. lanosum* (пушистый микроспорум), *M. equinum* (лошадиный микроспорум), *M. gypseum* (гипсовый микроспорум). Мицелий грибов прямой, разветвленный, септированный. По мере развития гриба распадается, образуя округлые, резко преломляющие свет споры 3–4 мкм в диаметре. На поверхности и внутри волоса споры располагаются беспорядочно в виде мозаики.

Культивирование. *M. lanosum* — возбудитель микроспороза у собак и кошек. На сусло-агаре через 2–3 сут. после посева появляются круглые с концентрическими кругами серовато-белые колонии; с возрастом центр колоний становится мучнистым. Обратная сторона колоний желтая.

При микроскопировании культуры виден септированный, разветвленный гребешковидный мицелий.

M. equinum — возбудитель микроспороза лошадей. На среде Сабуро образует кожистые, складчатые колонии, покрытые серо-белым септированным воздушным мицелием. Цвет зрелых колоний желтый или коричневый, обратная сторона желтая. Микроконидии грушевидные, редкие. Макроконидии многоклеточные (15–20×12–17 мкм).

M. gypseum — возбудитель микроспороза у лошадей, собак, кошек, крыс, мышей. На сусло-агаре дает плоские, с возрастом мучнистые, неправильно-складчатые колонии. Цвет колоний темноватый, светло-коричневый, оборотная сторона рыжевато-коричневая.

Мицелий ракетообразный с большим количеством микроконидий. Пораженные волосы флюоресцируют в результате продуцирования грибом флюоресцирующего пигмента — интенидина (Вольф, 1957).

Антигенная структура изучена мало. Установлено, что у различных грибов она неодинакова. Положительную кожную реакцию у иммунизированных кроликов вызывает только протеиновая фракция.

Устойчивость. Микроспорумы в пораженных волосах, кожных соскобах способны сохраняться до 2–5 лет. В сухожаровых камерах при 140°C гриб погибает за 30 мин, при 80°C — за 2 ч, при кипячении — за 2–3 мин. Под действием 3% -ного раствора формальдегида и 5–8% -ных растворов гидроксида натрия — в течение 20–30 мин.

Спецодежду обеззараживают кипячением в 2% -ном мыльно-содовом растворе в течение 15 мин или замачивают в 5% -ном растворе хлорамина (3 ч), 5% -ном растворе лизола (20 мин). Спецодежду и предметы ухода лучше обезвреживать в пароформалиновой камере в течение 40–50 мин.

Патогенность. *M. equinum* вызывает микроспороз у лошадей в естественных условиях и в эксперименте. Из лабораторных животных к нему чувствительна морская свинка, в скарифицированную кожу которой втирают культуру гриба или патологический материал (пораженные волосы, кожные соскобы); возможно заражение им человека.

С целью дифференциации грибов рода *Microsporum* от *Trichophyton* у кошек и собак используют люминесцентный метод: исследуемый материал рассматривают под ультрафиолетовым излучением ртутно-кварцевой лампы типа ПРК-2 или ПРК-4 с фильтром Вуда на расстоянии 20 см в затемненной комнате. Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение, споры трихофитон не светятся.

Лечение. Для специфической профилактики применяют вакцину «Ментовак». С лечебной целью используют мазь юглон или 2% -ную мазь перихотецина на рыбьем жире, препарат РОСК. На протяжении 2–3 нед. с кормом задают гризеофульвин из расчета 25–30 мг на 1 кг живой массы.

2.20. ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОТОКСИКОЗОВ

Микотоксикозы — болезни, возникающие у сельскохозяйственных животных после поедания кормов, загрязненных токсинами, вырабатываемыми микроскопически грибами. Различают две группы микотоксикозов: отравления токсинами грибов, паразитирующих на вегетирующих растениях, и отравления токсинами грибов-сапрофитов, поражающих корма во время их хранения.

ВОЗБУДИТЕЛИ АСПЕРГИЛЛОТОКСИКОЗОВ

Аспергиллотоксикозы (*Aspergillotoxicosis*) — алиментарные микотоксикозы сельскохозяйственных животных, возникающие при скармливании им кормов, пораженных аспергиллами. Грибы из рода *Aspergillus* распространены повсеместно.

Широко встречаются и более детально изучены аспергиллотоксикозы, вызываемые токсинами грибов *Aspergillus fumigates*, — это аспергиллофумигатотоксикоз и *Aspergillus flavus* — аспергиллофлавитоксикоз (афлатоксикоз).

Морфология и культивирование грибов описаны в разделе «Возбудители аспергиллеза».

Токсинообразование. Грибы рода *Aspergillus*, продуцируя токсины, вызывают аспергиллотоксикозы.

A. fumigates — возбудитель аспергиллофумигатотоксикоза — типичный представитель микрофлоры почв, зерна, грубых кормов — продуцирует более десятка токсинов: фумигалин, фумигатин, фумигацин, мигалин, глиотоксин, спинулозин, коевую и гельволеву кислоту, трипадицин.

Установлено, что токсинообразование не всегда совпадает с процессом спорообразования, накопление токсических веществ идет параллельно росту и развитию гриба как на пораженных кормах (особенно на сене), так и на искусственных средах Чапека, сусло-агаре, глюкозопептонной среде.

A. flavus — возбудитель аспергиллофлавитоксикоза — продуцирует особо опасные токсины — афлатоксины, обладающие гепатотропным и канцерогенным действиями. По химической природе афлатоксины — производные кумарина. В их состав входят до десяти токсических компонентов: А, В₁, В₂, М₁, М₂, Р и др. Для утят и кроликов ЛД₅₀ токсина В₁ составляет 0,4 мг/кг, В₂ — 1,7 мг/кг. Афлатоксин В₁ признан наиболее сильным канцерогеном: доза 1,56 мг у утят вызывает цирроз печени.

Микотоксины аспергиллов обладают местным и общим действиями. Местный процесс характеризуется воспалением кожи, слизистых оболочек. Общее действие проявляется поражением центральной нервной системы за счет повреждающего действия токсинов на мембраны нервных клеток, нарушением процессов иммуногенеза.

Лабораторная диагностика. Для исследования в лабораторию направляют паренхиматозные органы погибших животных, соскобы с некротических участков, а также пробы подопризерительных кормов. Проводят микроскопию и микологическое исследование кормов, а также проверку их токсичности на лабораторных животных.

Для установления афлатоксинов используют экспресс-методы, в частности методы тонкослойной хроматографии и ИФА.

Биопрепараты. Специфические средства лечения и профилактики отсутствуют.

ВОЗБУДИТЕЛИ ФУЗАРИОТОКСИКОЗА

Фузариотоксикозы (*Fusariotoxicoses*) — алиментарные микотоксикозы, вызываемые грибами рода *Fusarium*, содержащимися в кормах. Отравление животных наблюдают при пастбище по стерне осенью или на лугах с молодой травой ранней весной после заморозков. Грибы рода *Fusarium* относятся к порядку гифомицетов (*Hyphales*), классу несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*), семейству *Tuberculariaceae*.

В настоящее время выделено три типа фузариотоксикозов: споротрихиеллотоксикозы (F_2 -токсикоз), фузариограминеаротоксикозы и фузарионивалетоксикозы, возбудителями которых являются соответственно *F. sporotrichiella*, *F. graminearum*, *F. nivale*.

Морфология. У грибов рода *Fusarium* мицелий септированный, хорошо развит, белого, розового или красного цвета. Микроконидии одноклеточные, с одной или тремя перегородками, овальные, яйцевидные, грушевидные или лимоноподобные, иногда шаровидные или веретенообразные. Образуются на воздушном мицелии и располагаются на конидиеносцах в виде головок или цепочек длиной 3–6 мкм.

Макроконидии многоклеточные (3–9 клеток), веретеновидные-серповидные, часто с ножкой у основания, с верхушечной клеткой, большей частью сильно согнутой или постепенно утолщающейся, заостренной или притупленной. В воздушном мицелии они образуются на конидиеносцах или в спородоциях.

Хламидоспоры шаровидные, грушевидные, яйцевидные, одно-двухклеточные, располагаются цепочкой или в клубочках

на концах гиф (терминальные) или по ходу мицелия (интеркалярные). Образуются в гифах мицелия, в строме, конидиях, конидиеносцах. Цвет их коричневый. Строма окрашена в желтый, розовый, красный, коричневый цвета.

Некоторые представители этого рода имеют и сумчатые стадии.

Культивирование. Фузарии выращивают на среде Чапека. Подозрительное зерно светло-серого или розового цвета помещают на среду и инкубируют при 22–25°C. В течение 3–5 сут. на среде вырастают пышные желтоватые колонии. Их пересевают на сусло-агар или картофельный агар с целью получения чистой культуры, которую исследуют под микроскопом, определяя морфологические особенности макроконидий, наличие микроконидий, их формы, образование хламидоспор, пигментацию.

Токсинообразование. Грибы рода *Fusarium* продуцируют различные токсины. Из *F. sporotrichiella* var. *poae* получены кристаллические вещества: поин, липотоксол, спорофузарин, поэфузарин, спорофузариногенин и поэфузариногенин. Эти же грибы продуцируют токсические метаболиты, которые относятся к группе трихотеценов: токсин Т-2 и диацетоксискирпенол. В природных условиях токсин Т-2 образуется при поражении грибом зерна, особенно кукурузы, грубых кормов. Наличие токсина Т-2 определяют с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в хлороформенных и ацетоновых экстрактах из мицелия гриба и пораженных фузарием субстратов. Токсины гриба *F. sporotrichiella* и его разновидностей устойчивы к действию физических и химических факторов.

F. gramineaarum продуцирует комплекс токсических метаболитов, способен вызывать аборт, а также бесплодие у крупного рогатого скота и свиноматок.

F. nivale (штамм Fn2B) продуцирует два токсина, вызывающих тошноту, сонливость и геморрагии, поражение клеток мозговой ткани мышей и кроликов: фузаренон X и ниваленол, которые относятся к группе трихотеценов типа Б. Токсические метаболиты из культуры фузария и пораженных им субстратов экстрагируют метанолом.

Патогенность. К фузариотоксикозам восприимчивы сельскохозяйственные животные всех видов. Токсины грибов, по-

ступая с кормом в пищеварительный тракт, проникают в кровеносную систему и разносятся по всему организму. В первую очередь поражается центральная нервная система, затем желудочно-кишечный тракт, паренхиматозные органы, костный мозг. Развиваются экссудативные дерматиты, атрофия тимуса и другие явления.

Диагностика включает в себя комплексное исследование с учетом анамнеза, клинических, патологоанатомических данных и токсикомикологического анализа кормов. Токсичность корма, пораженного грибами, проверяют на кроликах с помощью кожной реакции или путем подкожного заражения белых мышей, а также на простейших.

Некоторые исследователи для диагностики рекомендуют использовать аквариумных рыбок, 1,5–2-месячных цыплят, 9-суточные куриные эмбрионы; также вводят экстракт в дозе 0,1–0,2 мл в бородку курам.

Для серологического диагноза используют РСК, РП и иммунодиффузии.

Биопрепараты. Для специфической профилактики и терапии фузариотоксикозов не разработаны.

ВОЗБУДИТЕЛЬ СТАХИБОТРИОТОКСИКОЗА

Стахиботриотоксикоз (*Stachybotryotoxiecosis*) — остро-, реже подостропротекающий микотоксикоз сельскохозяйственных животных, возникающий при поедании кормов, пораженных токсическим грибом *Stachybotrys alternans*, растущим главным образом на сене и соломе. Данному заболеванию подвержены и люди.

Гриб относится к несовершенным грибам *Fungi imperfecti*, к роду *Stachybotrys*. Существуют токсические и нетоксические варианты гриба.

Морфология. Мицелий септирован (поперечными перегородками), многоклеточный. От мицелия вверх развиваются спороносные гифы, конидиеносцы со стеригмами и сидящими на них конидиями. Толщина гиф зависит от возраста и достигает 2–3 мкм. Конидиеносцы бесцветные, гладкие, в верхней части бородавчатые, оливково-бурого цвета, длиной 45–52 мкм и 4 мкм в диаметре. Стеригмы яйцевидные, розеткообразные,

по 6–8 лепестков булавовидной или яйцевидной формы. Конидии легко опадающие, одноклеточные, яйцевидные, темно-коричневого или черного цвета, длиной 8–12 мкм и шириной 6–8 мкм.

Культивирование. В естественных условиях гриб растет на влажных растительных кормах, богатых целлюлозой (солома, сено, зерно, силос), и в почве. На естественных субстратах образует черный, сажистый, легко снимающийся налет.

Для искусственного культивирования используют жидкие и плотные питательные среды (агаровую среду Чапека, Сабуро, сусло-агар и среду Ван-Итерсона). В жидких средах гриб дает поверхностный рост, вначале в виде пристеночного кольца, а начиная с 5–6 сут. — в виде пленки. Среда остается прозрачной. На плотных средах (среда Сабуро, агар Чапека) вырастают двухзонные колонии, в центре складчатые, черного цвета; на периферии колонии образуется белая каемка. Колонии непрозрачные, овальной формы. Сама среда постепенно окрашивается в черно-коричневый цвет. На фильтровальной бумаге со средой Ван-Итерсона на 7–12 сут. образуется черный, иногда с зеленоватым оттенком, сажистый налет. Оптимальная температура для роста и развития гриба 20–27°C, влажность 45–50%. Органы плодоношения развиваются через 50–70 сут.

Биохимические свойства. Возбудитель стахиботриотоксикоза является типичным разрушителем целлюлозы.

Токсикообразование. Образование и накопление токсинов в пораженных грибом субстратах, а также на питательных средах, идет параллельно процессу накопления биомассы и пигмента и заканчивается одновременно с окончанием роста гриба. Из культуры гриба *S. alternans* выделен стахиботриотоксин, повреждающий кожу; токсин В-3, блокирующий сердечную мышцу; роринин Е и верукарин I. Токсин стабилен при хранении, устойчив к нагреванию, высушиванию, действию рентгеновского и ультрафиолетового излучений.

Двухчасовая обработка пораженного корма в автоклаве при 112°C ведет к полному разрушению токсических веществ. Нейтрализация их достигается 0,5% -ным раствором NaOH, 1% -ным раствором аммиака и 5% -ной суспензией извести. Дрожжевание и молочнокислое брожение не детоксифицируют пораженный корм.

Устойчивость. Споры *S. alternans* до 6 мес. сохраняют жизнеспособность в почве, скирдах соломы и стеблях растений, а при достаточной влажности и плюсовой температуре прорастают. При температуре -35°C гриб сохраняет жизнеспособность. Прямые солнечные лучи, воздействующие в течение 10–15 мин, замедляют прорастание конидий гриба; рассеянный свет, рентгеновское и ультрафиолетовое излучения почти не оказывают на них влияния. При воздействии текучим паром гриб на влажной соломе гибнет в течение 2–3 мин. Сухой жар (120°C) убивает конидии в течение 1 ч, горячая вода (88°C) — за 30 мин.

Отмечено фунгицидное действие на гриб и его споры 2% -ного раствора NaOH на протяжении 1 ч; 2% -ного раствора карболовой кислоты — 30 мин; 1% -ного — 1 сут.; 0,5% -ного — 2 сут.; 5% -ного раствора аммиака — 30 мин.

Патогенность. К стахиботриотоксикозу восприимчивы лошади, свиньи и жвачные. Вспышка стахиботриотоксикоза отмечена у буйволов после скармливания вместе с силосом соломы, пораженной грибом. Описаны случаи стахиботриотоксикоза у лосей, бизонов и других диких животных. Отмечено, что молодняк молочного периода не болеет.

В основе патогенеза лежит действие токсинов, которые из пищеварительного тракта поступают в кровеносную и лимфатическую системы и разносятся по всему организму. Через несколько часов токсин поражает центральную нервную систему, вызывает глубокие изменения в кроветворных органах и сосудистой системе. В кровеносных сосудах возникают воспалительные и некротические процессы — стенки сосудов становятся дряблыми и порозными. Отмечаются множественные кровоизлияния на слизистых и серозных покровах.

Изменения физико-химических свойств крови приводят к нарушению кровообращения, возникают гиперемия, геморрагический диатез, отек легких, уменьшается количество тромбоцитов, что приводит к замедленному свертыванию крови. Патологические изменения развиваются в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, печени.

Лабораторная диагностика. Диагноз на стахиботриотоксикоз ставят на основании учета эпизоотологических данных (поражение корма, массовое появление болезни, сезонность,

отсутствие заболеваний у молодняка, высокая летальность и др.), результатов клинического и гематологического исследований, патологоанатомического вскрытия и микологического исследования кормов.

В лабораторию посылают пробы соломы, сена и зернофуража, покрытые черным сажистым налетом, массой 20–30 г каждая. Кроме того, на исследование отправляют кал лошадей, а у погибших — пораженные участки кишечника, преджелудков, костный мозг, печень, кровь. Исследование включает в себя микроскопию, выделение гриба *S. alternans* из кормов и определение его токсичности.

Для микроскопии темный налет соскабливают и помещают на предметное стекло в каплю 5% -ного водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и среднем увеличении. В поле зрения видны темноокрашенные конидиеносцы, стеригмы и конидии. Вместо глицерина можно использовать дистиллированную воду.

Для получения чистой культуры отбирают соломинки с черным налетом и нарезают кусочки длиной 1,5–2 см. Эти соломинки, или пораженные зерна, помещают в стерильные бактериологические чашки с фильтровальной бумагой, увлажненной жидкой средой Чапека, и инкубируют при 24–26°C. Через 3–4 сут. (в положительном случае) развиваются морфологические элементы, характерные для гриба *S. alternans*; через 7–12 сут. — интенсивный темнопорошистый сажистый налет, который пересекает петлей на агар Чапека. На 5–7 сут. выросшую культуру исследуют под микроскопом и на токсичность.

Токсичность определяют методом кожной пробы на кролике. Для этого 50 г пораженной грибом измельченной соломы помещают в бумажные патроны из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Сокслета серным эфиром в течение 6 ч. Эфир отгоняют, полученный экстракт переносят в сосуд и конденсируют при комнатной температуре до испарения эфира. Вместо эфира можно использовать ацетон, хлороформ или другие органические растворители. Полученный экстракт двукратно наносят на выбритую поверхность кожи кролика размером 3×3 см. Если исследуемая солома содержит токсин, то на месте нанесения экстракта через 3–4 сут. появляется воспалительная

реакция в виде гиперемии, отечности тканей с последующим развитием некроза. На контрольном участке кожи с другой стороны у того же кролика при втирании экстракта из непораженной соломы видимые изменения отсутствуют. Чтобы кролик не слизывал нанесенный на кожу экстракт, ему надевают специальный воротник.

Биопрепараты. Специфические средства терапии и профилактики отсутствуют. В случаях необходимости используют симптоматическую лекарственную терапию (детоксирующие и вяжущие средства).

2.21. ВОЗБУДИТЕЛИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Вирусы — очень мелкие организмы, измеряемые нанометрами (10^{-9} м) и видимые в электронном микроскопе. Различают простые вирусы, состоящие из нуклеиновой кислоты и белка, и сложные вирусы, которые кроме данных компонентов содержат также липиды и углеводы. Белки образуют капсид — защитную оболочку нуклеиновой кислоты вириона. Капсид состоит из капсомеров — белковых субъединиц, численность которых постоянна для определенного вируса. У простых вирусов вирион — нуклеокапсид, у сложных — нуклеокапсид покрыт еще липопротеиновой оболочкой (суперкапсид). Вирионы разные по форме и размерам.

Вирусы содержат только одну нуклеиновую кислоту — ДНК или РНК. Нуклеиновая кислота ряда вирусов после проникновения ее в клетку может вызывать инфекционную болезнь. Белки составляют основную массу вириона, в них заключены антигенные и иммуногенные свойства вируса. Некоторые из вирионных белков обладают ферментативной активностью.

Возбудитель ящура. Вирус ящура относится к семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Известно семь серологических типов: А, О, С, Sat-1, Sat-2, Sat-3 и Азия-1. Внутри основных типов существуют варианты или подвиды, отличающиеся друг от друга.

Возбудитель ящура вызывает острое контагиозное заболевание парнокопытных животных с типичными поражениями.

Ящуром болеет и человек. Наиболее часто заражение происходит вследствие непосредственного контакта больных животных со здоровыми. Ящур относится к зооантропонозной болезни. В его распространении серьезную роль играют продукты и сырье животного происхождения, корма, предметы ухода за скотом и не восприимчивые к ящурю животные. Заражение человека происходит при уходе за больными животными и при употреблении сырого молока от больных коров.

Диагноз основан прежде всего на эпизоотологических данных, клинических признаках и патологоанатомических изменениях. Лабораторные методы диагностики используются для уточнения поставленного диагноза и определения типов и вариантов. Патологическим материалом являются кровь, стенки и содержимое афт и кусочки сердечной мышцы. Схема лабораторной диагностики:

- 1) экспресс-методы РИФ, РСК;
- 2) вирусологические исследования:
 - выделение вируса на мышатах-сосунах, морских свинках, крольчатах, культуре клеток свиной почки, естественно восприимчивых животных;
 - идентификация выделенного вируса в РСК, РДП, РН;
- 3) ретроспективная диагностика с использованием указанных серологических реакций.

Для специфической профилактики ящура разработаны и применяются в нашей стране инактивированные вакцины. Для общей профилактики необходимо соблюдать ветеринарно-санитарные меры.

Возбудитель бешенства. Вирус принадлежит к семейству *Rabdoviridae*, роду *Lyssavirus* и вызывает острую инфекционную болезнь с поражением центральной нервной системы. Восприимчивы все теплокровные животные и человек. Резервуаром инфекции служат только дикие и домашние плотоядные определенных видов. Вирус передается от больных животных со слюной при укусах. Однако возможно заражение и при попадании слюны на поврежденную кожу.

Предположительный диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических данных и клинических признаков болезни. Окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторных исследований. Патологическим материа-

лом служат свежие трупы мелких животных, от крупных павших животных — голова или головной мозг, кровь.

Схема лабораторной диагностики:

1) экспресс-методы РИФ, РГА, обнаружение телец Бабеша — Негри, ИФА;

2) выделение вируса на мышатах-сосунах, кроликах, морских свинках, культуре клеток почки сирийского хомячка и др. Идентификация выделенного вируса в РДП, РИФ и ИФА с помощью моноклональных антител;

3) ретроспективная диагностика: РДП, ИФА, РН и РСК.

В настоящее время для специфической профилактики бешенства применяют инактивированные и живые вакцины. В неблагополучных пунктах вводят ограничения, которые снимают через 2 мес. после последнего случая гибели или уничтожения больного животного.

Возбудитель чумы свиней. Вирус относится к семейству *Flaviviridae*. Антигенные типы и варианты вируса чумы свиней не установлены. Болеют только домашние и дикие свиньи независимо от возраста и породы. Источник возбудителя инфекции — инфекционно больные животные. Факторы передачи возбудителя — загрязненные выделениями больными животными корма, вода, подстилка, навоз и др. Болезнь возникает в любое время года, проникает в виде эпизоотии, летальность — 80–100% .

Диагноз ставят на основании эпизоотологических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований. Патологоанатомическим материалом служат кровь, кусочки селезенки, лимфоузлов, грудной кости, почек и легких.

Схема лабораторной диагностики включает:

1) экспресс-методы РИФ, электронная микроскопия;

2) вирусологические исследования: выделение вируса в культуре клеток почки свиней и семенников поросят, на поросятах; идентификация выделенного вируса в РИФ, РНГА и др;

3) ретроспективная диагностика: РНГА, РНИФ, РН, РДП и ИФА.

Для специфической профилактики применяют сухие вирусвакцины из аттенуированных штаммов вируса чумы свиней. Для пассивной иммунизации используют противочумную гипериммунную сыворотку крови.

При появлении чумы свиней на хозяйство накладывается карантин и его снимают через 40 дней после последнего случая падежа или убоя больных свиней.

Возбудитель гриппа. Все вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomixoviridae*, которое включает три рода: А, В и С. Вирус гриппа типа А вызывает острую контагиозную вирусную болезнь (классическую чуму птиц). В 1981 г. на Первом международном симпозиуме по гриппу птицы (США) рекомендовано отказаться от термина «чума кур», так как в 1955 г. было показано, что вирусы, вызывающие «чуму», — это вирусы гриппа рода А.

Вирусы гриппа рода А вызывают заболевание у человека, животных и птиц, рода С — у человека и свиней. Источник возбудителя — больные и переболевшие животные и птицы. Кроме того, вирус может попасть в организм с кормом и водой; носителем вируса зачастую оказывается обслуживающий персонал. Путь заражения — воздушно-капельный. Грипп проникает в форме эпизоотий в хозяйствах, где много способствующих распространению болезнетворных факторов (сырость, скученность, плохое кормление и т. д.). Заболеваемость нередко доходит до 100%, летальность сильно варьирует и зависит от многих факторов.

Предварительный диагноз на грипп ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Для окончательного диагноза необходимо провести лабораторные исследования.

Патологическим материалом служат труп целиком, кровь, выделения из носа, бронхиальный экссудат, от павших птиц кусочки легких.

Лабораторная диагностика включает:

1) экспресс-методы РГА, РИФ, электронная микроскопия;
2) вирусологические исследования: выделение вируса на хорьках, белых крысах и мышах, КЭ, культуре клеток, на восприимчивых животных; идентификация выделенного вируса в РИФ, РТГА и ИФА;

3) ретроспективная диагностика: РНГА, РНИФ, РН, РДП и ИФА.

Дифференциальный диагноз. Необходимо исключить у свиней — пневмонию хламидиозной природы, аденовирусную инфекцию, микоплазмоз; у лошадей — ринопневмонию; у птиц —

ньякаслскую болезнь, инфекционный бронхит, респираторный микоплазмоз; у телят — паратиф, гепатит, ньюкаслскую болезнь.

Иммунитет высоко штаммоспецифичен. Специфические средства лечения отсутствуют. Для вакцинации используют живые и инактивированные вакцины.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. К какому семейству и роду относится возбудитель* болезни?
2. Как называется возбудитель?
3. Какие виды возбудителей существуют?
4. Как называются болезни, вызываемые отдельными возбудителями, и какие животные восприимчивы?
5. Охарактеризуйте возбудителей (размеры, особенности морфологии и химического состава).
6. Какими антигенными свойствами обладает возбудитель?
7. Каковы морфологические и культуральные особенности возбудителя?
8. Каковы биологические свойства и спектр патогенности возбудителей?
9. Какие методы используют для дифференциации одного возбудителя от других?
10. Какой метод окрашивания возбудителя применяют для определения формы, спор, капсул и других особенностей?
11. Как определяется подвижность микробов?
12. Какие питательные среды используют для культивирования и каков характер роста бактерий в жидких и на плотных средах?
13. Каковы биохимические свойства возбудителя?
14. На каких животных и как ставят биологическую пробу?
15. Какие серологические методы существуют для обнаружения антигена и идентификации возбудителя?
16. При каких болезнях используют аллергический метод диагностики?
17. Каково название аллергена? Какие биопрепараты используют для диагностики, лечения и профилактики болезни, вызываемой конкретным возбудителем?

*Приведенные вопросы касаются всех возбудителей инфекционных болезней, рассматриваемых в этой главе.

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

**ОСНОВЫ УЧЕНИЯ
ОБ ИНФЕКЦИИ
И ИММУНИТЕТЕ**

3.1. ТИПЫ БИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ С МАКРООРГАНИЗМОМ

Из огромного числа микроорганизмов, обитающих в природе, только незначительная часть болезнетворна. В процессе многовековой эволюции одни виды микробов, приспособившись к извлечению пищевых ресурсов из неживой природы, до сегодняшнего момента остаются свободноживущими, другие виды постепенно адаптировались к сожительству с животными или растениями и за их счет получают питательные вещества.

Всякое сосуществование микроорганизма с макроорганизмом представляет собой симбиоз, характеризующийся различными типами биотических взаимоотношений по отношению к клеткам своего хозяина — мутуализмом, комменсализмом, паразитизмом.

Мутуализм — такая форма сосуществования, когда оба симбионта (хозяин и микроб) получают взаимную выгоду. Некоторые виды бактерий, обитая в кишечнике, продуцируют витамины, которые используются в организме животных для биокаталитических реакций. Кишечная палочка, например, синтезирует и выделяет в окружающую среду витамины группы В, а также витамин К. Бактерии многих других видов продуцируют витамины В₁, В₁₂, а также витамин К.

Примером мутуализма служит сожительство растений с клубеньковыми бактериями, которые питаются веществами из соков растения (например, бобовых — горох, вика), а растения, в свою очередь, используют азотистые соединения, синтезирован-

ные клубеньковыми бактериями, которые являются фиксаторами азота.

Комменсализм — такая форма сосуществования, когда один из симбионтов (в данном случае микроб) живет за счет хозяина, пользуется его защитой, но не причиняет хозяину никакого вреда. Микробы-комменсалы (стафилококки, стрептококки) населяют в качестве нормальной микрофлоры кожные покровы и слизистые оболочки животных. Однако следует признать, что комменсализм в этом случае относительное понятие, потому что среди представителей условно-патогенной микрофлоры имеются такие, которые при определенных условиях могут вызывать тяжелые заболевания.

Паразитизм — такая форма сожительства, когда микробы-паразиты питаются компонентами тканей хозяина, при этом причиняют ему вред, вызывая инфекционную болезнь, и не могут существовать без него. Такие микроорганизмы называются *патогенными*. Следовательно, среда обитания паразита — организм хозяина, с его морфологическими, физиологическими и защитными свойствами являющийся внешней средой первого порядка (по Павловскому), к которой паразит адаптируется в процессе эволюции. Эта среда непосредственно влияет на паразитов так же, как и паразиты влияют на хозяина. Окружающая среда в обычном понимании влияет на таких паразитов уже опосредованно, через организм хозяина.

В процессе эволюции адаптация паразитов к хозяину шла по линии специализации, в частности путем приобретения способности паразитировать в определенных тканях, например, возбудители сибирской язвы, пастереллеза паразитировали в крови; бруцеллы — в плаценте; возбудитель туберкулеза — в лимфоидной ткани; сальмонеллы — в слизистой тонкого кишечника; возбудитель ящура, оспы — в эпидермисе и слизистой оболочке; бешенства — в нервной ткани и т. д. В этом случае речь идет о тропизме паразитов, т. е. способности избирательно поражать преимущественно те или иные органы и ткани.

Многие болезнетворные микроорганизмы, попадая в организм животного, никак не влияют друг на друга, т. е. между ними нет взаимодействия, такая ситуация называется *нейтральностью*. Различными могут быть и пространственные отношения между симбионтами. Если один симбионт находится вне

клеток другого, то тут можно говорить об *эктосимбиозе*, а если внутри клеток, то об *эндосимбиозе*. Более крупного из симбионтов называют *хозяином*.

Микробиологические аспекты инфекции также предусматривают формирование ряда важнейших категорий. Ассоциированные инфекции вызываются двумя или более возбудителями. *Ассоциация микроорганизмов* — сообщество различных их видов, существующее в естественно или искусственно созданных условиях, например, жизнь анаэробов совместно с аэробами в среде, содержащей свободный кислород. Ассоциация микроорганизмов имеет большое значение при вирусных и микоплазменных инфекциях респираторных органов, в частности у крупного рогатого скота в условиях промышленных животноводческих комплексов.

Синергизм — одинаковые физиологические процессы различных микробных ассоциаций, в результате которых происходит увеличение конечных продуктов.

Сателлизм — стимуляция роста одного микроба продуктами жизнедеятельности другого, который затем становится его спутником.

Антагонизм — противоположное действие, взаимное противодействие микроорганизмов, лекарственных средств и т. д. Антагонизм микробов — сложное взаимоотношение, когда при совместном развитии популяций бактерии одного вида или внутри одного и того же вида угнетают развитие других, а иногда полностью их уничтожают. Антагонизм микробов широко используют для профилактики и лечения различных болезней, главным образом желудочно-кишечных. Например, многие штаммы кишечной палочки способны подавлять развитие и уничтожать стрептококки, стафилококки, сибиреязвенную палочку, сальмонеллы, возбудителей злокачественного отека и туберкулеза.

3.2. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ, ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ

Среди многочисленных болезней, которым подвержены человек и животные, инфекционные занимают особое место, так как появление их обязано встрече с болезнетворными микробами. На современном этапе развития науки под

инфекцией (от лат. *infectio* — заражение) понимают состояние, при котором развивается эволюционно сложившийся комплекс биологических реакций взаимодействия макроорганизма и патогенных микробов.

Состояние инфекции, как всякого биологического процесса, динамично. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют *инфекционным процессом*, который, с одной стороны, включает внедрение, размножение и распространение патогенного микроба в организме, а с другой — реакцию организма на это действие. Эти реакции выражаются в биохимических, морфологических, функциональных и иммунологических изменениях, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма.

Наиболее яркой формой проявления инфекции является инфекционная болезнь, которая обусловлена патологическими процессами, вызванными действием возбудителя, и характеризуется определенной клинической картиной. Инфекционная болезнь имеет ряд особенностей, отличающих ее от болезней неинфекционного характера.

1. Инфекционную болезнь вызывают определенные специфические возбудители.

2. Больной организм сам становится источником возбудителя инфекции, так как заражает здоровых животных.

3. В больном организме происходят процессы образования специфических антител, благодаря чему организм после выздоровления становится в большинстве случаев иммунным, т. е. невосприимчивым к повторному заражению тем же возбудителем.

Инфекционный процесс может протекать бессимптомно, скрыто, латентно (бессимптомная, или скрытая, инфекция). Следствием скрытой инфекции может быть иммунизирующая субинфекция — состояние, когда патогенные микробы, проникая в организм животного в небольших дозах и неоднократно, вызывают иммунобиологические реакции, выработку специфических антител и защитных механизмов, но сами при этом погибают. У таких животных не выявляются функциональные расстройства, а после уоя не обнаруживаются патологические изменения в органах и тканях.

Инфекционный процесс характеризуется циклическим развитием и включает в себя следующие периоды: инкубационный,

продромальный, клинический (разгар болезни), выздоровление (реконвалесценция).

Инкубационный период — определенный промежуток времени от момента проникновения микроба в организм до появления первых признаков болезни. При разных инфекционных болезнях он неодинаков и составляет от нескольких дней, месяцев до нескольких лет.

Продромальный период (период предвестника болезни) — это период появления первых, не всегда специфических для данной болезни симптомов: повышение температуры тела, слабость, угнетение, потеря аппетита. Продолжительность его от нескольких часов до четырех дней.

Период развития основных клинических признаков (разгара болезни) — это время, в течение которого проявляются основные характерные для данной инфекционной болезни признаки (при ячуре — афты; при бешенстве — параличи; при ботулизме — расслабление мышц), а также угнетение, высокая температура, нарушение дыхания, пищеварения и др.

Период выздоровления (реконвалесценции) — постепенное восстановление физиологических функций организма. Клиническое выздоровление при многих инфекционных болезнях не совпадает по времени с освобождением организма от возбудителя.

Иногда микробы, проникнув в организм, остаются только в поврежденной ткани и, размножаясь, выделяют токсины, которые, проникая в кровь, вызывают более тяжелые формы отравления. Такой процесс называется *токсемией*.

Бактериемия — такое состояние, когда микробы находятся в крови временно и не размножаются в ней, а посредством ее только переносятся в другие чувствительные ткани и органы.

Сепсис, или *септицемия*, — процесс, характеризующийся размножением микробов в крови и локализацией их в различных органах и тканях организма. Для него характерны быстрота и нередко смертельный исход. Септицемия отмечается при многих инфекционных болезнях: сибирской язве, роже свиней, колибактериозе и др. Сепсис, вызываемый разными возбудителями, характеризуется в самом начале одинаковой клинической картиной, что приводит к затруднению постановки диагноза.

Если в результате распространения патогенных микробов по лимфатическим и кровеносным путям в отдельных органах

возникают гнойные очаги, процесс называется *септикопиемией*. Такой вид инфекции наблюдается при мытье лошадей, вызываемом стрептококком.

По характеру проявления инфекционные болезни делятся на кишечные (колибактериоз, сальмонеллез), респираторные (туберкулез, оспа), инфекции кожных покровов и слизистых оболочек (столбняк, сибирская язва, ящур). Возбудители *кишечных инфекций* передаются алиментарным путем (корм, вода, предметы ухода). *Инфекции дыхательных путей* распространяются воздушно-капельным, реже воздушно-пылевым путем. Для *кровяных инфекций* характерен трансмиссивный путь передачи через кровососущих насекомых (вши, клещи, комары, блохи и пр.). *Возбудители инфекций кожных покровов и слизистых оболочек* передаются через предметы обихода, прямым контактом, например посредством укуса (бешенство) или половым путем (кампилобактериоз).

По характеру возникновения выделяют *экзогенные* и *эндогенные* инфекции. В случае, когда заражение происходит в результате попадания патогенных микробов извне, говорят об *экзогенной* (гетерогенной) инфекции (ящур, сибирская язва, чума).

В случаях, когда условно-патогенные микробы, находящиеся в организме, не проявляют свою патогенность в силу высокой резистентности макроорганизма, а при ослаблении его резистентности (истощение, авитаминоз, охлаждение) активизируют свои патогенные свойства, вызывая болезнь, говорят об *эндогенной* (спонтанной, аутоинфекции) инфекции.

В случаях, когда организм переболел какой-либо болезнью и освободился от возбудителя, но не приобрел стойкого иммунитета и при повторном заражении этим же возбудителем заболел, можно говорить о *реинфекции*.

Повторное заражение организма, у которого не закончилось основное заболевание, называется *суперинфекцией*. Она встречается при многих инфекционных болезнях, протекающих в острой и хронической формах.

Иногда болезнь протекает без клинических признаков вследствие наступившего равновесия между макро- и микроорганизмом. Возврат симптомов той же болезни называют *рецидивом*, а периоды между рецидивами называют *ремиссиями*. Рецидивы

характерны для инфекционной анемии лошадей, сальмонеллезов и других инфекционных болезней.

Если болезнь вызвана одним возбудителем, то ее называют *простой*, или *моноинфекцией*. Когда в организм животного проникают два и более возбудителя, вызывающих болезнь, то говорят о *смешанной инфекции*. Например, крупный рогатый скот может одновременно болеть туберкулезом и бруцеллезом. Наличие смешанных инфекций усложняет организацию противоэпизоотических мероприятий и вызывает иногда значительные трудности при диагностике болезней.

Вторичная, или *секундарная*, инфекция — это такая инфекция, которая возникает вслед за первичной (основной) инфекцией. Возбудителями вторичных инфекций являются условно-патогенные микробы. Например, при чуме свиней вторичная инфекция — пастереллез. Его возбудитель обнаруживается в дыхательных путях у здоровых свиней, при ослаблении организма (например, заболевании чумой) он вызывает вторичную инфекцию.

После переболевания инфекционной болезнью в одних случаях организм полностью освобождается от возбудителя в результате образования иммунитета, в ряде других случаев после выздоровления возбудитель длительное время сохраняется в макроорганизме. Такое состояние называют *микробоносительством* (сальмонеллез, пастереллез, туберкулез и др.). Животные в таком состоянии представляют опасность как источники возбудителя инфекции.

Существует микробоносительство, которое не связано с предшествующим переболеванием, оно не сопровождается иммунологической перестройкой и его выявляют только при бактериологическом исследовании. Такое состояние закономерно до момента активации условно-патогенной микрофлоры. Так, например, резистентные животные могут быть носителями сальмонелл, пастерелл, возбудителя рожи свиней и др. Возможно также кратковременное носительство возбудителя, не свойственного животным данного вида. Например, свиньи могут быть носителями вируса инфекционной анемии лошадей, а собаки — чумы свиней. Следует помнить, что здоровые животные (микробоносители) могут служить источником возбудителя инфекции.

При неблагоприятном исходе инфекционной болезни животное может погибнуть очень быстро или через продолжительное время в результате постепенного ослабления и истощения. В связи с этим по форме течения и клиническому проявлению инфекционного заболевания различают сверхострое (молниеносное), острое, подострое, хроническое, abortивное, типичное и атипичное.

Сверхострое течение длится всего несколько часов, при этом типичные клинические признаки не успевают развиться из-за гибели животного. *Острое течение* болезни продолжается от одного до нескольких дней, для него характерно проявление типичных клинических признаков. *Подострое течение* болезни более продолжительное, клинические признаки тоже типичны, но выражены менее четко. При *хроническом течении* болезнь может затянуться на месяцы и годы. При этом клинические признаки слабо выражены, а временами вообще отсутствуют. Такое течение болезнь принимает при снижении вирулентности возбудителя и достаточно высокой резистентности организма животных. Если типичное развитие болезни внезапно останавливается и наступает выздоровление, то течение болезни называют *abortивным (атипичная форма)*. Большинство инфекционных болезней характеризуется наличием определенных, явно выраженных клинических признаков. Такая форма болезни называется *типичной*. Инфекционный процесс может быстро заканчиваться выздоровлением животного — это *доброкачественное течение*. При пониженной естественной резистентности организма и наличии высоковирулентного возбудителя болезнь может принимать *злокачественное течение*, характеризующееся высокой летальностью.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ИНФЕКЦИИ ПУТЕМ ВНЕДРЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРОБОВ В ОРГАНИЗМЕ

Для возникновения инфекционной болезни необходимо наличие следующих условий:

- 1) микроб должен быть достаточно вирулентным;
- 2) необходимо внедрение определенного количества микробов;

3) микробы должны проникнуть в организм через благоприятные для них «входные ворота инфекции» и достичь восприимчивых тканей;

4) организм хозяина должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни;

5) условия среды должны благоприятствовать взаимодействию между микробом и организмом.

Судьба патогенных микробов, попавших в организм, может быть различной в зависимости от состояния организма и вирулентности возбудителя. Некоторые микробы, попав с током крови в определенные органы, оседают (задерживаются) в их тканях, размножаются и вызывают заболевание, например возбудитель туберкулеза в легочной ткани. Любая инфекционная болезнь независимо от клинических признаков и локализации микробов в организме представляет собой заболевание всего организма.

ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Инфекционная болезнь, возникает только при наличии возбудителя, обладающего патогенностью вообще и вирулентностью в частности.

Патогенность (от *греч.* *pathos* — болезнь, *genes* — рождающий) — видовой генетический признак возбудителя, его потенциальная способность вызывать при благоприятных условиях специфический инфекционный процесс. По этому признаку все существующие микроорганизмы подразделяют на патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. Фактически все возбудители инфекционных болезней являются патогенными, но чтобы вызвать инфекционную болезнь, они должны обладать вирулентностью. Нельзя ставить знак равенства между патогенностью и вирулентностью. Микроорганизм считается вирулентным, если он при внедрении в организм животного даже в исключительно малых дозах вызывает развитие инфекционного процесса. Никто не сомневается в патогенности сибиреязвенной бациллы, между тем среди культур этого микроба изредка, но встречаются авирулентные штаммы, не способные вызвать заболевания у животных. Бактерии рожи свиней принадлежат к патогенному виду, но немало их разновидностей было выделено из организма совершенно здоровых свиней, индеек, рыб.

Вирулентность — это степень патогенности конкретного микроорганизма, т. е. это индивидуальный признак. Ее можно измерить. За единицу измерения вирулентности условно приняты летальная и инфицирующая дозы. *Минимальная смертельная доза* — DLM (*Dosis letalis minima*) — это наименьшее количество живых микробов или их токсинов, вызывающее за определенный срок гибель большинства взятых в опыт животных определенного вида. Но поскольку индивидуальная чувствительность животных к патогенному микробу (токсину) различна, то была введена *безусловно смертельная доза* — DCL (*Dosis certa letalis*), вызывающая гибель 100% зараженных животных. Наиболее точная единица вирулентности *средняя летальная доза* — LD₅₀, т. е. наименьшая доза микробов (токсинов), убивающая половину животных в опыте. Для установления летальной дозы принимают во внимание способ введения возбудителя, возраст подопытных животных, а также массу, например, белые мыши — 16–18 г, морские свинки — 350 г, кролики — 2 кг. Таким же образом определяют *инфицирующую дозу* (ID), т. е. количество микробов или их токсинов, которое вызывает соответствующую инфекционную болезнь.

Высоковирулентные микроорганизмы способны вызывать болезни у животных или человека даже в минимальных дозах. Известно, что 2–3 микобактерии туберкулеза при введении в трахею морской свинки вызывают туберкулез со смертельным исходом. Вирулентные штаммы сибиреязвенной бациллы в количестве 1–2 клеток могут вызвать смерть у морской свинки, белой мыши и даже крупного животного.

У одного и того же микроорганизма вирулентность может значительно колебаться в зависимости от ряда биологических, физических и химических факторов, воздействующих на него. Вирулентность микроорганизма можно усилить или ослабить искусственными приемами. *Ослабление* вирулентности микроорганизмов вызывает длительное выращивание культур вне организма на обычных питательных средах при максимальной температуре (опыты Л. Пастера и Л. С. Ценковского), действие химических веществ — добавление к культурам антисептиков (двухромовокислый калий, карболовая кислота, щелочь, сулема, желчь и т. д.).

Пассирование (пассаж — последовательное проведение) возбудителя какой-либо инфекционной болезни через определенный вид животного от зараженного к здоровому, например возбудителя рожи свиней через организм кролика, ослабляет вирулентность для свиней, но усиливает ее для самих кроликов. Действие бактериофага (биологический фактор) может привести к ослаблению вирулентности микроорганизмов.

Усиление вирулентности под действием протеолитических ферментов происходит у *C. perfringens* при естественной ассоциации с возбудителями гниения (например, сарцинами) или при искусственном воздействии ферментом животного происхождения (например, трипсином).

Вирулентность микроорганизмов связана с токсигенностью и инвазивностью.

Токсигенность (от греч. toxicum — яд и лат. genus — происхождение) — способность микроба образовывать токсины, которые вредно действуют на макроорганизм путем изменения его метаболических функций.

Инвазивность (от лат. invasio — нашествие, нападение) — способность микроба преодолевать защитные барьеры организма, проникать в органы, ткани и полости, размножаться в них и подавлять защитные средства макроорганизма. Инвазионные свойства патогенных бактерий обеспечиваются за счет микробных ферментов (гиалуронидаза), капсул и других химических компонентов микробов.

Под **основными факторами патогенности** понимают приспособительные механизмы возбудителей инфекционных болезней к меняющимся условиям макроорганизма, синтезируемые в виде специализированных структурных или функциональных молекул, при помощи которых они участвуют в осуществлении инфекционного процесса. По функциональному значению их разделяют на четыре группы.

I — микробные ферменты, деполимеризующие структуры, препятствующие проникновению и распространению возбудителя в макроорганизме.

II — поверхностные структуры бактерий, способствующие закреплению их в макроорганизме.

III — поверхностные структуры бактерий, обладающие антифагоцитарным действием.

IV — факторы патогенности с токсической функцией.

При этом факторы патогенности первых трех групп обуславливают инвазионность, последней — токсичность патогенных микроорганизмов.

I группа.

Гиалуронидаза. Повышает проницаемость тканей макроорганизма. Кожа, подкожная клетчатка и межмышечная клетчатка содержат мукополисахариды и гиалуроновую кислоту, которые замедляют проникновение через эти ткани чужеродных веществ, даже в жидком состоянии. Гиалуронидаза способна расщеплять мукополисахариды и гиалуроновую кислоту, в результате чего повышается проницаемость тканей и микроорганизм свободно продвигается в глуболежащие ткани и органы животного организма. Синтезируют этот фермент бруцеллы, гемолитические стрептококки, клостридии и другие микроорганизмы.

Фибринолизин. Разжижает плотные сгустки крови (фибрин). Некоторые штаммы гемолитического стрептококка, стафилококков, иерсиний синтезируют фибринолизин. Гиалуронидаза и фибринолизин увеличивают способность патогенных микробов генерализовывать процесс и устраняют химико-механические препятствия на пути внедрения микробов вглубь тканей.

Нейраминидаза. Отщепляет от различных углеводов связанные с ними гликозидной связью концевые сиаловые кислоты, которые деполимеризуют соответствующие поверхностные структуры эпителиальных и других клеток организма, разжижают носовой секрет и муцинозный слой кишечника. Синтезируют пастереллы, иерсинии, некоторые клостридии, стрепто- и диплококки, вибрионы и др.

ДНК-азы (дезоксирибонуклеазы). Деполимеризуют нуклеиновую кислоту, обычно появляющуюся при разрушении лейкоцитов в воспалительном очаге на месте внедрения микробов. Продуцируют фермент стафилококки, стрептококки, клостридии и др.

Коллагеназа. Гидролизует входящие в состав коллагена, желатина и других соединений пептиды, содержащие пролин. В результате расщепления коллагеновых структур наступает расплавление мышечной ткани. Вырабатывают фермент клостридии злокачественного отека, особенно сильно *Clostridium histolyticum*.

Коагулаза. Свертывает цитратную или оксалатную кровяную плазму человека и животных. Продуцируют фермент вирулентные штаммы золотистого стафилококка, некоторые штаммы кишечной палочки и сенной бациллы. Свертывание цитратной крови происходит вследствие выработки перечисленными микроорганизмами фермента коагулазы.

II группа включает в себя патогенные микроорганизмы, которые благодаря наличию ворсинок, жгутиков, пилей, рибитотейхоевой и липотейхоевой кислот, липопротеидов и липополисахаридов способны закрепляться в макроорганизме. Это явление названо *адгезией*, т. е. способность микроба адсорбироваться (прилипнуть) на чувствительных клетках. Адгезивность хорошо выражена у эшерихий (штаммы K-88, K-99), которые продуцируют соответствующие белковые антигены, позволяющие бактериям прикрепляться к слизистой оболочке тонких кишок, накапливаться в больших количествах, продуцировать токсины и таким образом поражать макроорганизм.

III группа включает в себя бактерии, содержащие поверхностные структуры, обладающие антифагоцитарным действием. К ним относятся А-протеин золотистого стафилококка, М-протеин пиогенного стрептококка, Vi-антиген сальмонелл, липиды корд-фактора микобактерий туберкулеза и др. Механизм антифагоцитарного действия этих микробов объясняют не токсигенностью, а способностью блокировать антитела (опсонины) или отдельные фракции комплемента (например, C₃), способствующие фагоцитозу.

Бациллы сибирской язвы, пневмококки могут синтезировать выраженную капсулу, хорошо заметную в мазках-отпечатках, приготовленных из свежего патологического материала или из культур, выращенных на сывороточных средах. Доказано, что капсульное вещество — полисахарид у пневмококков, полипептид d-глутаминовой кислоты у сибиреязвенной бациллы — не простая механическая преграда для бактерицидных соков организма, химических, лекарственных веществ, антибиотиков; капсула и ее вещество защищают бактерии от перегрева. Капсула подавляет фагоцитоз бактерий, обеспечивает их устойчивость к антителам и усиливает их инвазионные свойства. Например, капсулообразующие сибиреязвенные ба-

циллы не подвергаются фагоцитозу, в то время как бескапсульные варианты легко фагоцитируются.

Данный фактор патогенности сибиреязвенного микроба настолько важен, что его используют в качестве критерия для оценки степени вирулентности возбудителя сибирской язвы. В медицинской и ветеринарной практике успешно используют против сибирской язвы вакцины (СТИ и ВГНКИ), представляющие собой взвесь жизнеспособных спор бескапсульных штаммов сибиреязвенных бацилл.

К этой же группе факторов патогенности можно отнести нетоксичные неантигенные капсульные структуры некоторых стрептококков (например, группы А), содержащие гиалуроновую кислоту. Ввиду общности с межклеточным веществом макроорганизма они, вероятно, не распознаются хозяином и остаются нефагоцитированными.

IV группа включает в себя токсины. Среди токсинов микробного происхождения различают экзо- и эндотоксины. *Экзотоксины* — высокоактивные яды, выделяемые микроорганизмом на протяжении его жизни в качестве продуктов обмена в окружающую среду (организм животного, пробирка с культурой микроба). *Эндотоксины* менее ядовиты по сравнению с экзотоксинами, образуются в результате распада микробной клетки. Следовательно, эндотоксины представляют собой фрагменты или отдельные химические компоненты микробных клеток.

РОЛЬ МАКРООРГАНИЗМА И УСЛОВИЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

При изучении инфекционных болезней какое-то время животный организм рассматривали как пассивную арену деятельности патогенного микроба, который непостоянен в своих свойствах и вызывает инфекцию при любых условиях. Состояние же макроорганизма и влияние факторов окружающей среды во внимание не принимали. Однако различия в восприимчивости животных и человека даже к таким опаснейшим заразным болезням, как чума и холера, указывали на ошибочность такого мнения. Работы Л. Пастера и особенно И. И. Мечникова убедительно показали, что инфекционный процесс зависит не только

от вирулентности и дозы микроба-возбудителя, но и от состояния защитных сил макроорганизма, которое определяется весьма многими факторами: реактивностью (способностью проявлять защитно-приспособительные функции), конституцией и кондицией, состоянием ЦНС и др. Естественная резистентность, в свою очередь, во многом зависит от условий окружающей среды. Вызванное любой причиной ослабление организма способствует развитию инфекции.

Голодание. Один из сильнейших факторов, снижающих устойчивость организма против заражения. Систематическое недоедание обычно ведет к появлению массовых болезней среди людей и животных. Если в кормах недостает того или иного питательного вещества, это может усилить патологическое состояние организма, способствовать развитию инфекционной болезни. Известно, например, что отсутствие в кормах витаминов, солей фосфора и кальция делает организм высокомолочных коров, даже при обильном кормлении, очень восприимчивым к заражению туберкулезом и бруцеллезом. Достаточное и полноценное кормление повышает устойчивость организма против инфекционных болезней, усиливает его способность противостоять вредным воздействиям патогенных микробов.

Водный режим. Недостаточное потребление животными воды снижает сопротивляемость их организма к инфекционным болезням. Экспериментально, путем искусственного водного голодания, удалось ослабить организм собак и заразить их возбудителем сибирской язвы, тогда как в обычных условиях они малочувствительны к этой инфекции.

Температура. Чрезмерно высокая или очень низкая температура может уменьшить устойчивость организма к инфекции. При переохлаждении, особенно у молодняка, проявляются простудные и диарейные заболевания (пневмонии, гастроэнтериты у поросят). У животных, вакцинированных с высокой температурой, напряженность иммунитета заметно снижается.

Утомление. Переутомление животных, вызванное чрезмерной эксплуатацией, может снизить устойчивость против инфекции. Известно много случаев обострения скрытой инфекции после усиленной эксплуатации животных. Например, сап, инфекционная анемия лошадей, пастереллез и др.

Нарушение санитарно-зоогигиенических норм содержания животных. Высокая влажность, отсутствие вентиляции, недостаточная освещенность помещений и другие также ведут к снижению общей сопротивляемости организма животных. На устойчивость организма влияют *возраст* и *порода* животных. Телята до 3-месячного возраста почти никогда не болеют бруцеллезом, поросята до 2–3 мес. реже болеют рожей свиней. Существуют болезни, которыми болеет только молодняк. Например, колибактериозом заболевает только молодняк в первые дни после рождения; эмфизематозный карбункул поражает телят в возрасте от 3 мес. до 4 лет.

3.3. ОСОБО ОПАСНЫЕ БОЛЕЗНИ, ПЕРЕКРЕСТНО ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ОТ ЖИВОТНЫХ К ЧЕЛОВЕКУ И НАОБОРОТ

Особо опасные болезни — это инфекционные болезни, возбудители которых относятся к I или II группе патогенности, перекрестно передающиеся от животных к человеку и наоборот, так называемые зооантропонозы.

Зооантропонозы — это инфекционные болезни, возбудители которых (бактерии, микроскопические грибы, риккетсии, вирусы, простейшие и др.) в процессе эволюции приспособились к паразитированию в организме животных и человека. Возбудители зооантропонозов, размножающиеся в организме, могут непродолжительное время, а иногда длительно сохраняться во внешней среде или в организме живого переносчика. Их источником являются больные и переболевшие животные-микробоносители, факторами передачи могут быть продукты, получаемые от больных животных при жизни (молоко, яйца) или после убоя (шерсть, мясо, шкуры), и различные объекты внешней среды, заражаемые выделениями больных животных.

К зооантропонозам относятся возбудители, которые могут перекрестно передаваться от животных к человеку и наоборот.

1. Поражающие кишечник — ботулизм, бруцеллез, иерсениоз, инфекция хламидийная, кампилобактериоз, лептоспирозы, листериоз, мелиоидоз, псевдотуберкулез, сальмонеллезы.

2. Поражающие дыхательные пути — хламидиоз (орнитоз), туберкулез, сар.

3. Поражающие кровеносную систему — риккетсиоз блошино-крысиный, чума, Ку-лихорадка, туляремия, инфекционная анемия лошадей, лейкоз.

4. Поражающие наружные покровы организма — пастереллез, сар, сибирская язва, столбняк, рожа свиней, некробактериоз, оспа, ящур.

5. Поражающие центральную нервную систему — бешенство, болезнь Ауески.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Укажите формы биотического взаимоотношения микроорганизмов.
2. Дайте понятие об инфекции, инфекционной болезни и инфекционном процессе.
3. Из каких периодов состоит инфекционный процесс?
4. Дайте определение патогенности и вирулентности микробов.
5. Что означают термины «реинфекция», «вторичная», или «вторичная инфекция»?
6. Какие процессы обозначаются терминами «сепсис», «септицемия», «бактериемия»?
7. Каковы пути внедрения и распространения патогенных микроорганизмов в организме?
8. Дайте сравнительную характеристику экзо- и эндотоксинов и ферментов, выделяемых микроорганизмами.
9. Перечислите возбудителей особо опасных болезней.

ГЛАВА 4. ВВЕДЕНИЕ В ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

С момента возникновения иммунология развивалась длительное время в составе других наук. За последние 40 лет она выделилась в самостоятельную обширную фундаментальную биологическую науку молекулярного уровня.

На протяжении тысячелетий человечество было совершенно беззащитным перед инфекционными болезнями. Древние письменности различных цивилизаций донесли до нас сведения об ужасных эпидемиях, опустошающих большие города и процветающие страны. Колоссальные потери несло человечество в Средние века и даже в более поздний период от чумы, оспы, холеры и других инфекционных болезней.

В основе иммунологии лежат наблюдения древних народов, так, например, уже в те времена было известно, что чумой повторно не заболевают. В Древнем Египте и Древней Греции переболевших чумой привлекали к уходу за больными и захоронению трупов. Отсюда и родилась идея преднамеренно заражать здоровых от тех больных, у которых заболевание протекало в легкой форме. Несколько веков тому назад в Турции и на Ближнем Востоке для профилактики оспы детям в скарифицированную кожу втирали гной из пустул больных оспой людей. Такое заражение обычно вызывало заболевание оспой в легкой форме, но создавало невосприимчивость к последующему заражению. Этот метод профилактики оспы получил название *вариоляции*. Однако в дальнейшем выяснилось, что метод вариоляции далеко не безопасен, так как иногда приводит к заболеванию

оспой в тяжелой форме и к смерти, а привитые сами становятся источником инфекции.

С давних времен было известно, что люди, переболевшие коровьей оспой, которая у человека протекает всегда в легкой форме, не заболевают натуральной оспой.

В конце XVIII в. английский врач Э. Дженнер сделал новый шаг в направлении внедрения в практику оспопрививания. В течение 25 лет многочисленными наблюдениями он проверял предположение о том, что заражение коровьей оспой предупреждает заболевание натуральной оспой, и пришел к заключению о его справедливости. В 1779 г. Э. Дженнер организовал первый в мире пункт по прививке возбудителем коровьей оспы. В 1796 г. он привил материал из гнойника женщины, заразившейся оспой от коровы, восьмилетнему мальчику. Спустя несколько дней у мальчика поднялась температура, и появился гнойник на месте введения инфекционного материала. Затем все эти явления исчезли. Спустя шесть недель ему ввели материал от оспенного больного, но он не заболел. Этим опытом впервые была установлена возможность предупреждения заболевания оспой. Э. Дженнер доказал, что заражение коровьей оспой человека вызывает только местный воспалительный процесс и что коровью оспу можно перевивать другим лицам, создавая невосприимчивость к натуральной оспе. В 1798 г. Э. Дженнер сообщил в печати о своих наблюдениях и разработанном методе прививок оспы человеку. Метод получил широкое распространение в Англии и других странах Европы, вследствие чего резко снизилась заболеваемость оспой. Хотя Э. Дженнер оказал величайшую услугу человечеству и еще при жизни заслужил признание, разработанный им метод был эмпирическим и не имел научной основы.

Научно обоснованные методы профилактики инфекционных болезней были разработаны великим французским ученым Л. Пастером. В 1880 г. он изучал куриную холеру. В одном из опытов для заражения кур Пастер использовал старую культуру возбудителя куриной холеры, хранившуюся длительное время при температуре 37°C. При этом часть инфицированных кур выжила, хотя при заражении суспензией суточной культуры все подопытные птицы обычно погибали. Выживших кур повторно заразили уже свежей культурой холеры, но вопреки

ожиданиям они не погибли. Из этого опыта Л. Пастер сделал заключение, что микробы могут терять способность вызывать гибель животных вследствие изменения их биологических свойств — снижения вирулентности, наступившей при длительном хранении культуры возбудителя.

В 1880 г. Л. Пастер сообщил об этом эксперименте в Парижской академии наук, высказав при этом гениальную догадку о возможности предупреждения инфекционных болезней ослабленными микробами. После этих наблюдений Л. Пастер приступил к изготовлению микробных препаратов для профилактики сибирской язвы. Снижение вирулентности сибиреязвенного микроба было достигнуто путем длительного выращивания его при 42,5°C. Эффективность разработанного Пастером метода публично была продемонстрирована в эксперименте на животных, предварительно дважды иммунизированных ослабленной культурой (24 подопытные овцы, шесть телят и один козел). После введения вирулентной культуры сибирской язвы все подопытные животные оставались живыми, а контрольные погибли от сибирской язвы.

Л. Пастер в честь первооткрывателя предохранительных прививок против оспы Э. Дженнера назвал ослабленные культуры возбудителей *вакциной* (от *лат.* *vaccina* — корова).

В дальнейшем Л. Пастер совместно с Э. Ру получил ослабленный вирус бешенства путем перевивки инфекционного материала от больных бешенством собак кроликам и от кроликов кроликам. Такой вирус был назван *фиксированным вирусом бешенства*. Л. Пастер применил вакцину для лечения мальчика, которого укусила больная собака. После проведения курса вакцинации мальчик выжил. Это был первый в истории человечества случай спасения от бешенства.

Разработанные Л. Пастером принципы получения вакцин и методы их применения для профилактики инфекционных болезней успешно используют уже на протяжении более 100 лет.

Основу иммунологии как науки заложили работы И. И. Мечникова. На основании широких исследований реакции организма на чужеродные вещества И. И. Мечников разработал фагоцитарную теорию иммунитета, согласно которой защита организма от проникших в него микробов осуществляется при помощи фагоцитов — подвижных клеток мезенхимального происхождения,

захватывающих чужеродные вещества и переваривающих их. Фагоцитоз при инфекции И. И. Мечников рассматривал не как специфическую реакцию, а как частное проявление трофической функции. Это была первая не умозрительная, а экспериментально обоснованная теория иммунитета. И. И. Мечников ввел понятие «клеточный иммунитет».

К 1885 г. в учении об иммунитете определилось два противоположных направления. Одно из них возглавлял И. И. Мечников. Он развивал теорию клеточного иммунитета и рассматривал фагоцитоз как основной фактор защиты организма от инфекции. Второе направление представлял немецкий ученый П. Эрлих, который считал, что основным защитным механизмом от инфекции являются гуморальные факторы сыворотки крови.

К концу XIX в. выяснилось, что эти две точки зрения дополняют друг друга, а не взаимоисключают. Представители обоих направлений внесли существенный вклад в развитие иммунологии. В 1908 г. за развитие учения об иммунитете И. И. Мечников и П. Эрлих были удостоены Нобелевской премии.

Созданная И. И. Мечниковым фагоцитарная теория иммунитета и разработанные Л. Пастером принципы получения и применения вакцин заложили фундамент иммунологии. Таким образом, Л. Пастер и И. И. Мечников явились основоположниками иммунологии.

В дореволюционной России противомикробный иммунитет изучали ученые, беззаветно служившие делу науки. Им принадлежит большая заслуга в области изучения иммунитета животных при особо опасных инфекциях: сибирской язве, сапе, чуме и перипневмонии крупного рогатого скота. В 1883 г. Л. С. Ценковский вслед за Л. Пастером создал отечественные вакцины (I и II) против сибирской язвы. В 1891 г. впервые в истории науки Х. И. Гельман совместно с О. И. Кальнингом приготовили маллеин для диагностики сапа лошадей.

Становлению и дальнейшему изучению противомикробного иммунитета способствовали труды С. Н. Вышелесского, Н. А. Михина, М. В. Рево, Я. Р. Коваленко, В. В. Никольского, П. М. Базылева, С. Г. Колесова, Х. Г. Гизатуллина, Х. Х. Абдуллина и др. Удостоены Государственной премии СССР исследователи, достигшие больших успехов в создании оригинальных

высокоэффективных иммунных препаратов, среди них: Н. В. Лихачев, А. А. Волкова, С. Я. Любашенко, И. И. Кулеско, А. Х. Саркисов и др.

Основные задачи практической иммунологии включают в себя:

1) изучение закономерностей формирования устойчивости макроорганизма к инфекционным болезням (иммунитет);

2) разработку и совершенствование методов серологической и аллергической диагностики инфекционных болезней;

3) изыскание и применение биопрепаратов (вакцины, иммунные сыворотки, гамма-глобулины, бактериофаги) для специфической профилактики и лечения инфекционных болезней животных.

4.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ИММУНИТЕТА

Иммунитет (от *лат.* *immunitas* — освобождение или избавление от чего-либо) — состояние невосприимчивости организма к воздействию патогенных микробов, их токсинов и других чужеродных веществ биологической природы.

Организм человека и животных весьма точно дифференцирует «свое» и «чужое», обеспечивая таким образом, защиту от внедрения не только патогенных микробов, но и чужеродных веществ. Следовательно, главное назначение иммунитета состоит в распознавании «своего» и «чужого», что жизненно важно. Поступление во внутреннюю среду организма веществ с признаками чужеродной информации (макромолекул белков, полисахаридов и др.) грозит нарушением структурного и химического состава этого организма. Количественное и качественное «постоянство» внутренней среды, называемое *гомеостазом*, обеспечивают процессы саморегулирования во всех живых системах. Иммунитет — одно из проявлений гомеостаза. В этой связи иммунитет является свойством всего живого: человека, животных, растений и даже бактерий.

Система органов и клеток, осуществляющая реагирование против чужеродных субстанций, получила название *иммунной системы* организма. Она распределена по всему организму, ее клетки постоянно рециркулируют по всему телу через кровяной ток, она обладает способностью вырабатывать сугубо специфические

молекулы антител, различные по своей специфике в отношении каждого антигена.

По происхождению различают два вида иммунитета: врожденный и приобретенный.

Врожденный иммунитет (естественный, видовой, наследственный, генетический) — это невосприимчивость к инфекционным агентам, детерминированная в геноме и проявляемая количеством и порядком расположения ганглиозитов определенного типа на поверхности мембран клеток. Этот вид иммунитета свойственен животным определенного вида к определенному возбудителю инфекции и передается из поколения в поколение. Например, лошади не болеют ящуром; крупный рогатый скот — сапом; собаки — чумой свиней и т. д. В основе механизмов врожденного иммунитета к определенным возбудителям лежит отсутствие в клетках организма рецепторов и субстратов, необходимых для адгезии и размножения возбудителя, т. е. наличие веществ, блокирующих размножение патогенных микробов. Последние не могут размножаться в организме, и заболевание не возникает. Например, бруцеллы могут размножаться в плаценте только тех видов животных, которые содержат углевод и эритритол.

Врожденный иммунитет весьма прочный, но не абсолютный. Так, в естественных условиях куры не болеют сибирской язвой, однако Л. Пастер заразил кур сибиреязвенной бациллой после искусственного переохлаждения, погружая их конечности в холодную воду. И. И. Мечникову удалось вызвать экспериментальный столбняк у лягушки (весьма устойчивой к столбнячному токсину) при перенагревании ее в термостате. Врожденной резистентностью в основном обладают взрослые животные, у новорожденных же во многих случаях видовая устойчивость отсутствует. Например, кролики-сосуны и мышата чувствительны к заражению вирусом ящура. Весьма чувствительны к вирусам и бактериям развивающиеся куриные эмбрионы, что на практике используют для получения вакцин.

Следует учитывать, что животные, не заболевая определенной инфекционной болезнью, могут быть носителями возбудителя и представлять опасность для других видов. Например, человек может быть носителем вируса чумы собак.

Важно отметить, что естественная невосприимчивость — это не только видовой признак, так как среди восприимчивых к определенным видам микробов существуют породы, популяции и линии животных, отличающиеся высокой устойчивостью к данному возбудителю. Так, при высокой чувствительности овец к сибирской язве алжирские овцы отличаются высокой к ней устойчивостью. Свины йоркширской породы по сравнению с другими породами устойчивее к роже свиней. Куры породы белый леггорн более устойчивы к пуллорозу, чем птицы пород красный родайленд и плимутрок.

Приобретенный иммунитет (специфический) — это устойчивость организма только к определенному возбудителю болезни, его характерной особенностью является специфичность. Приобретенный иммунитет подразделяют на естественный и искусственный.

Естественно приобретенный иммунитет делят на активный и пассивный. Активный (постинфекционный) иммунитет появляется после естественного переболевания животного.

Естественно приобретенный иммунитет возникает у животных, переболевших без клинически выраженных симптомов. Во многих случаях в организм животного систематически попадают дозы возбудителя меньше той, которая может вызвать заболевание. В этом случае происходит скрытая иммунизация, которая у животных, достигших определенного возраста, создает активный иммунитет к определенному возбудителю. Такое явление называют *иммунизирующей субинфекцией*.

Естественно приобретенный пассивный иммунитет — это иммунитет новорожденных, приобретенный при поступлении материнских антител через плаценту (трансплацентарный) либо после рождения через кишечник с молозивом (колостральный или молозивный). У птиц материнские антитела передаются с лецитиновой фракцией желтка (трансвариальный). Важно отметить, что насыщение кровотока новорожденных животных (жвачных, лошадей, свиней) иммунными фракциями происходит в основном колостральным путем. В связи с этим различают естественно и искусственно вызванный *колостральный иммунитет*. Естественный колостральный иммунитет обусловлен антителами, выработанными в организме матери под воздействием

различных антигенов окружающей среды, искусственный — специфическими антителами, выработанными при искусственной иммунизации организма матери определенными антигенами (вакцинами) против определенного возбудителя болезни.

Молозиво неиммунизированных коров обладает бактериостатическим и антитоксическим свойствами в отношении многих патогенных микроорганизмов — кишечной палочки, сальмонелл, стафилококков и др. Так, в молозиве в среднем при первой дойке содержится в 100 мл Ig — 900 мг (Ig G — 200 мг, Ig M — 400 мг, Ig — 300 мг), а в таком же количестве молока уже соответственно 50, 2, 5 и 8 мг. Воспринятые с молозивом иммуноглобулины (антитела) в кишечнике, например новорожденных телят, адсорбируются и неизменными проходят через стенку кишечника в лимфатическую систему, а затем в кровеносное русло. Следует знать, что у домашних животных кишечник проницаем для молозивных антител лишь в течение первых 24–36 ч, поэтому молозиво новорожденный должен получить как можно раньше и больше с момента рождения.

Естественно приобретенный активный иммунитет может сохраняться 1–2 года, но в некоторых случаях и пожизненно (например, у собак, переболевших чумой; у овец, переболевших оспой). Естественно приобретенный пассивный иммунитет обеспечивает состояние невосприимчивости от 2 до 3-х недель.

Искусственно приобретенный иммунитет, в свою очередь также подразделяют на активный и пассивный. Активный (поствакцинальный) возникает в результате иммунизации животных вакцинами. Он развивается в организме в течение 7–14 сут. после вакцинации и сохраняется от нескольких месяцев до одного года и более. Пассивный иммунитет создается при введении в организм иммунной сыворотки, содержащей специфические антитела против определенного возбудителя болезни. Такой иммунитет можно создать и при введении сывороток крови животных-реконвалесцентов (переболевших данной болезнью), например при ящуре. Пассивный иммунитет, как правило, длится не более 15 сут.

Иммунитет также принято классифицировать по направленности действия защитных механизмов организма на микроорганизмы и их продукты жизнедеятельности — токсины:

- *антибактериальный иммунитет*: защитные механизмы направлены против патогенного микроба, в результате предотвращается размножение и распространение в нем микроба;
- *противовирусный иммунитет*: обусловлен выработкой организмом противовирусных антител и механизмами клеточной защиты;
- *антитоксический иммунитет*: бактерии не разрушаются, но организм больного животного вырабатывает антитела, эффективно нейтрализующие токсины;
- *иммунитет при протозойных и гельминтозных* заболеваниях направлен на обезвреживание и уничтожение возбудителей болезней.

Существует также *местный* (локальный) *иммунитет*. Данное понятие было предложено А. М. Безредка в 1925 г. Логическим выводом из теории местного иммунитета послужило изыскание методов локальной иммунизации тканей и органов, представляющих собой ворота инфекции, т. е. первого защитного барьера против инфекционного агента. В связи с этим в практической деятельности стали широко применять аэрогенный и пероральный способы иммунизации.

Если после перенесенной болезни организм освобождается от возбудителя, сохраняя при этом состояние невосприимчивости, то такой иммунитет называют *стерильным*. Однако при многих инфекциях иммунитет сохраняется только до тех пор, пока в организме находится возбудитель болезни. В этом случае говорят об *инфекционном* или *нестерильном иммунитете* (премуниция).

В зависимости от механизмов защиты организма различают гуморальный и клеточный иммунитеты.

Гуморальный иммунитет — одна из форм приобретенного иммунитета. Он играет важную роль в противоинфекционной защите организма и обуславливается специфическими антителами, выработанными в ответ на чужеродный антиген. При гуморальном иммунитете в крови присутствуют специфические антитела, что наиболее ярко проявляется в нейтрализации бактериальных токсинов антитоксинами (при столбняке, ботулизме, анаэробных инфекциях), в реакции нейтрализации вирусов вируснейтрализующими антителами, в сенсibilизации бактерий к фагоцитозу

и бактериолизу. Гуморальный иммунитет включает в себя реакции и механизмы иммунного ответа, обусловленные выработкой в зараженном организме специфических антител. Также считается, что патогенные микроорганизмы, размножающиеся в организме внеклеточно, определяют гуморальный иммунитет.

Клеточный иммунитет по ряду признаков принципиально отличается от гуморального, и в первую очередь тем, что его эффекторными элементами служат лимфоциты, а не гуморально-плазматические клетки. Эту форму реакции организма на антиген в связи с особенностями клеточного иммунного ответа принято называть клеточным иммунитетом, который обуславливается образованием специфических, реагирующих с возбудителем (антигеном) Т-лимфоцитов.

Термин «клеточный иммунитет» в иммунологической литературе употребляют в качестве синонима другого термина — «повышенная чувствительность замедленного типа», получившего такое название потому, что ее классические проявления (феномен Коха, реакция на туберкулез) развиваются в более поздние сроки, чем повышенная чувствительность немедленного типа (анафилаксия).

Клеточный иммунитет имеет особое значение при инфекциях, вызванных многими вирусами, бактериями, грибами, при отторжении трансплантата, в противоопухолевом иммунитете и при аутоиммунных заболеваниях. Например, вирусы, бактерии, грибы, находящиеся внутри клетки, могут быть уничтожены только при помощи клеточного иммунитета.

В механизме клеточного иммунитета различают три фазы:

- 1) распознавание антигена;
- 2) образование эффекторных клеток и клеток памяти;
- 3) эффекторная фаза, обусловленная действием клеток-эффекторов или синтезируемых ими медиаторов.

Клеточные формы иммунного реагирования связаны со специфическим иммунным функционированием самих Т-лимфоцитов, их рецепторного аппарата распознавания и соединения с антигеном. Основную функцию по уничтожению чужеродных антигенных субстанций осуществляют непосредственно сами клетки. Считается, что в реакциях клеточного иммунитета участвуют несколько субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-киллеры и природные киллеры).

4.2. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ (ЕСТЕСТВЕННЫЕ) ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Со времени становления иммунологии как науки возникло представление о врожденном и приобретенном противомикробном иммунитете. Врожденный иммунитет к данной инфекции — это состояние, не зависящее от имевшегося ранее спонтанного или экспериментально вызванного контакта с возбудителем или с его антигенами. Врожденный иммунитет — наследуемая устойчивость животных против определенного возбудителя, в основном видовая и породная. Приобретенный иммунитет — невосприимчивость, возникающая у животных в процессе естественного переболевания соответствующей инфекционной болезнью или искусственно созданная в здоровом организме путем его иммунизации биопрепаратами (вакциной, сывоткой).

Таким образом, защита организма от инфекции складывается из последовательного включения в борьбу с проникшим возбудителем трех различных эшелонов этой защиты, составляющих единый функциональный комплекс, включающий в себя:

- 1) факторы естественной резистентности;
- 2) ранний индуцибельный ответ;
- 3) адаптивный или приобретенный иммунный ответ.

Неспецифический (естественный) противомикробный иммунитет обеспечивают следующие факторы:

- 1) анатомо-физиологические;
- 2) гуморальные;
- 3) клеточные.

АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Макроорганизмом в ходе эволюции были выработаны защитные механизмы от возбудителя. Для проникновения в восприимчивые клетки и ткани микробу необходимо преодолеть немало защитных барьеров.

Кожно-слизистые барьеры. Первую атаку микроба-агрессора испытывают неповрежденные кожа и слизистые оболочки, это не только механическая преграда, но и стерилизующий

фактор в отношении многих видов микроорганизмов. Кожа и слизистые оболочки покрыты слоем эпителиальных постоянно обновляющихся клеток, преграждающих путь микробу. Вместе с ними при постоянно происходящем слущивании эпителия удаляется и осевшая на нем патогенная микрофлора. На чистой коже относительно быстро погибают некоторые виды бактерий. Например, культура чудесной палочки, нанесенная на здоровую кожу человека, погибает спустя 20 мин. Бактерицидное действие кожи обусловлено веществами, выделяемыми потовыми и сальными железами, а также содержащимися в коже жирными кислотами.

Выраженными барьерными свойствами обладают также конъюнктивы, слизистая оболочка носа и др.

Секреты желез пищеварительного тракта наряду со своими физиологическими функциями обладают способностью обезвреживать многих болезнетворных микробов. Слюна — первый секрет, действующий на пищевые вещества, а также микрофлору, поступающие в ротовую полость. Желудочный сок также обладает бактерицидным и бактериостатическим действием на ряд видов патогенных микробов, однако в содержимом желудка выживают туберкулезные и спорообразующие бактерии. Желчь действует бактериостатически на ряд микроорганизмов. Слезная жидкость оказывает бактерицидное действие на патогенные микробы, особенно из группы кокков.

Болезнетворные микробы, преодолевшие кожный и слизистый барьеры, начинают массированное проникновение в ткани. В инфицированном участке огромная масса фагоцитов создает защитный вал вокруг микроорганизмов. Возникает местный воспалительный процесс, который ограничивает распространение микробов в соседние ткани и кровь. И. И. Мечников первым указал на защитную роль воспаления. Воспаление — сложная сосудисто-тканевая защитно-приспособительная реакция организма на действие патогенного раздражителя. Оно выполняет защиту организма от воздействия патогенного фактора в виде специфических реакций — фагоцитоза и выработки антител. Благодаря воспалительной реакции фокус повреждения отграничивается от всего организма, происходит ликвидация патогенного фактора, повышение местного и общего иммунитета. При определенных условиях воспаление может приобретать

иногда патологическое значение для организма (некроз тканей, нарушение функций).

Лимфатическая система. При дальнейшем продвижении в ткани и кровь микробы встречают новый барьер — лимфатические узлы. Они расположены по ходу лимфатических сосудов и играют роль своеобразных фильтров, задерживающих микробные клетки и другие нерастворимые частицы.

Если возбудителю удастся преодолеть и эти защитные преграды, то в макроорганизме происходит изменение обмена веществ и определенных физиологических процессов. Так, при многих инфекциях повышается температура тела в связи с усилением обменных и энергетических процессов. Лихорадочную реакцию, особенно в начальной фазе болезни, следует рассматривать как защитную. Установлено губительное действие повышенной температуры (38–40°C) на некоторые вирусы. Повышение мочеотделения и потоотделения способствует освобождению организма от ряда возбудителей. При кишечных болезнях диарея сопровождается обильным выделением из организма возбудителей.

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Гуморальные факторы неспецифической защиты организма включают в себя нормальные (естественные) антитела, лизоцим, пропердин, бетализины (лизины), комплемент, интерферон, ингибиторы вирусов в сыворотке крови и ряд других веществ, постоянно присутствующих в организме.

Нормальные антитела (естественные). В крови животных и человека, которые ранее никогда не болели и не подвергались иммунизации, могут быть обнаружены вещества, вступающие в реакцию со многими антигенами, но в низких титрах, не превышающих разведения 1:10–1:40. Эти вещества были названы нормальными, или природными антителами. Считается, что они возникают в результате естественной иммунизации различными микроорганизмами.

Лизоцим. Лизосомальный фермент присутствует в слезах, слюне, носовой слизи, секрете слизистых оболочек, сыворотке крови и экстрактах органов и тканей, в молоке, в белке куриных яиц. Лизоцим устойчив к нагреванию (инактивируется при

кипячении), обладает свойством лизировать живые и убитые в основном грамположительные микроорганизмы.

Секреторный иммуноглобулин А постоянно присутствует в содержимом секретов слизистых оболочек, молочных и слюнных желез, в кишечном тракте. Обладает выраженными противомикробными и противовирусными свойствами.

Пропердин (от лат. pro и perdere — подготовить к разрушению) описан в 1954 г. в виде полимера как фактор неспецифической защиты и цитолизина. Его количество в нормальной сыворотке крови — до 25 мкг/мл. Это сывороточный белок (бета-глобулин) с молекулярной массой 220 тыс. ЕД. Пропердин принимает участие в разрушении микробной клетки, нейтрализации вирусов. Он действует в составе пропердиновой системы: пропердин плюс комплемент и двухвалентные ионы магния. Нативный пропердин играет значительную роль в неспецифической активации комплемента (альтернативный путь активации).

Лизины — это белки сыворотки крови, обладающие способностью лизировать (растворять) некоторые бактерии и эритроциты. В сыворотке крови многих животных присутствуют бета-лизины, вызывающие лизис культуры сенной палочки, а также многих патогенных микробов.

Лактоферрин — негеминовый гликопротеид, обладающий железосвязывающей активностью, связывающий два атома трехвалентного железа. Он конкурирует с микробами, в результате чего их рост подавляется. Синтезируется полиморфноядерными лейкоцитами и гроздьевидными клетками железистого эпителия, является специфическим компонентом секрета различных желез (слюнных, слезных, молочных, дыхательного, пищеварительного и мочеполового трактов). Лактоферрин — фактор местного иммунитета, защищающий от микробов эпителиальные покровы.

Комплемент — многокомпонентная система белков сыворотки крови и других жидкостей организма, которые играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Впервые его описал Г. Бухнер в 1889 г. под названием «алексин» — термолabile фактор, в присутствии которого происходит лизис микробов. Термин «комплемент» ввел П. Эрлих в 1895 г. Комплемент весьма неустойчив. Было замечено, что специфические антитела в

присутствии свежей сыворотки крови способны вызывать гемолиз эритроцитов или лизис бактериальной клетки, но если сыворотку перед постановкой реакции прогреть при 56°C в течение 30 мин, то лизис не произойдет. Оказалось, что гемолиз (лизис) происходит за счет наличия комплемента в свежей сыворотке. Наибольшее количество комплемента содержится в сыворотке морской свинки.

Интерферон был выявлен в 1957 г. английскими вирусологами А. Айзексом и И. Линдерманом. Первоначально он рассматривался как фактор противовирусной защиты. В дальнейшем выяснилось, что это группа белковых веществ, функция которых заключается в обеспечении генетического гомеостаза клетки. В качестве индукторов образования интерферона, помимо вирусов, выступают бактерии, бактериальные токсины, митогены и др.

Интерферон принимает участие в регуляции различных механизмов иммунного ответа: усиливает цитотоксическое действие сенсibilизированных лимфоцитов и К-клеток, оказывает антипролиферативное и противоопухолевое действие и др. Он обладает видотканевой специфичностью, т. е. более активен в той биологической системе, в которой выработан, но защищает клетки от вирусной инфекции лишь в том случае, если воздействует на них до контакта с вирусом.

Ингибиторы — неспецифические противовирусные вещества белковой природы, присутствуют в нормальной нативной сыворотке крови, секретах эпителия слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов, в экстрактах органов и тканей. Обладают способностью подавлять активность вирусов в крови и жидкостях вне чувствительной клетки. Ингибиторы подразделяют на термолабильные (теряют свою активность при прогревании сыворотки крови до 60–62°C в течение 1 ч) и термостабильные (выдерживают нагревание до 100°C). Они обладают универсальной вируснейтрализующей и антигем-агглютинирующей активностью в отношении многих вирусов.

Ингибиторы тканей, секретов и экскретов животных оказались активными в отношении многих вирусов, так, например, секреторные ингибиторы респираторного тракта обладают антигем-агглютинирующей и вируснейтрализующей активностью.

Бактерицидная активность сыворотки крови (БАС). Свежая сыворотка крови человека и животных обладает выраженными бактериостатическими свойствами в отношении ряда возбудителей инфекционных болезней. Основные компоненты, подавляющие рост и развитие микроорганизмов, — это нормальные антитела, лизоцим, пропердин, комплемент, монокины, лейкоины и другие вещества. Поэтому БАС является интегрированным выражением противомикробных свойств гуморальных факторов неспецифической защиты. Она зависит от состояния здоровья животных, условий их содержания и кормления, так, при плохом содержании и кормлении активность сыворотки значительно снижается.

Определение БАС основано на способности сыворотки крови подавлять рост микроорганизмов, что зависит от уровня нормальных антител, пропердина, комплемента и др. Реакцию ставят при температуре 37°C с различными разведениями сыворотки, в которые вносят определенную дозу микробов. Разведение сыворотки позволяет установить не только ее способность подавлять рост микробов, но и силу бактерицидного действия, что выражается в единицах.

Защитно-адаптационные механизмы. К неспецифическим факторам защиты также относится стресс. Факторы, вызывающие стресс, были названы Г. Силье стрессорами. По Г. Силье стресс — особое неспецифическое состояние организма, возникающее в ответ на действие различных повреждающих факторов окружающей среды (стрессоров). Кроме патогенных микроорганизмов и их токсинов в качестве стрессоров могут выступать холод, голод, тепло, ионизирующее излучение и другие агенты, обладающие способностью вызывать ответные реакции организма. Адаптационный синдром может быть общим и местным. Он обуславливается действием гипофизарно-адренокортикотропной системы, связанной с гипоталамическим центром. Под влиянием стрессора гипофиз начинает усиленно выделять адренокортикотропный гормон (АКТГ), стимулирующий функции надпочечников, вызывая у них усиленное выделение противовоспалительного гормона типа кортизона, снижающего защитно-воспалительную реакцию. Если действие стрессора слишком сильно или продолжительно, то в процессе адаптации возникает болезнь.

При интенсификации животноводства количество стрессовых факторов, воздействию которых подвергаются животные, значительно возрастает. Поэтому профилактика стрессовых воздействий, снижающих естественную резистентность организма и обуславливающих заболевания, является одной из важнейших задач ветеринарной службы.

КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Неспецифическую резистентность макроорганизма обеспечивает фагоцитарная активность микро- и макрофагов.

Фагоцитоз (от *греч.* phago — ем, cytos — клетка) — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных живых или убитых микробов и других чужеродных частиц с последующим перевариванием при помощи внутриклеточных ферментов. У простейших организмов он обеспечивает одновременно функции питания (поглощение, переваривание) и защиты клеток. На наиболее высоких стадиях эволюции фагоцитоз выполняет только защитные функции с помощью дифференцированной системы клеток.

Фагоцитирующие клетки подразделяют на две основные категории: *микрофаги*, или полиморфно-нуклеарные фагоциты (ПМН), и *макрофаги*, или мононуклеарные фагоциты (МН). Абсолютное большинство фагоцитирующих ПМН составляют нейтрофилы. Среди макрофагов различают подвижные (циркулирующие) и неподвижные (оседлые) клетки. Подвижные макрофаги — это моноциты периферической крови, а неподвижные — макрофаги печени, селезенки, лимфатических узлов, выстилающие стенки мелких сосудов и других органов и тканей.

Одним из основных функциональных элементов микро- и макрофагов являются лизосомы — гранулы диаметром 0,25–0,5 мкм, содержащие большой набор ферментов (кислая фосфатаза, В-глюкоронидаза, миелопероксидаза, коллагеназа, лизоцим и др.) и ряд других веществ (катионные белки, фагоцитин, лактоферрин), способных участвовать в разрушении различных антигенов.

Процесс фагоцитоза включает следующие этапы:

- хемотаксис и прилипание (адгезия) частиц к поверхности фагоцитов;

- постепенное погружение (захват) частиц в клетку с последующим отделением части клеточной мембраны и образованием фагосомы;
- слияние фагосомы с лизосомами;
- ферментативное переваривание захваченных частиц и удаление оставшихся микробных элементов.

Активность фагоцитоза связана с наличием в сыворотке крови *опсоинов* — белков нормальной сыворотки крови, вступающих в соединение с микробами, благодаря чему последние становятся более доступными фагоцитозу. Различают термостабильные и термолабильные опсоины. Первые в основном относятся к иммуноглобулину G, хотя могут способствовать фагоцитозу, вторые относятся к иммуноглобулинам А и М. К термолабильным опсоинам (разрушаются в течение 20 мин при температуре 56°C) относятся компоненты системы комплемента — C1, C2, C3 и C4.

Фагоцитоз, при котором происходит гибель фагоцитированного микроба, называют *завершенным* (совершенным). Процесс, когда микробы, находящиеся внутри фагоцитов, не погибают, называют *незавершенным* фагоцитозом.

Последующее развитие фагоцитарной теории внесло поправки в представления И. И. Мечникова о фагоцитозе как универсальном и господствующем механизме защиты от всех существующих инфекций.

4.3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Специфический иммунный ответ у животных осуществляет иммунная система, обладающая уникальной способностью распознавать множество разнообразных микроорганизмов, чужеродные агенты и молекулы, называемые антигенами, и вырабатывать в ответ специфические антитела и сенсибилизированные лимфоциты.

Антигены (от *лат.* *anti* — против, *genes* — род, происхождение) — все вещества, которые несут признаки генетической чужеродности и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций.

Антигенные вещества представляют собой высокомолекулярные соединения, обладающие определенными свойствами:

чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью, коллоидной структурой и определенной молекулярной массой. Антигенами могут быть разнообразные вещества белковой природы, а также белки в соединении с липидами и полисахаридами. Антигенными свойствами обладают клетки животного и растительного происхождения, яды животных (змей, скорпионов, пчел и др.) и растений (рицин, кортин и др.), сложные комплексы, состоящие из полисахаридов, липидов, белков. Антигенными свойствами обладают вирусы, бактерии, микроскопические грибы, простейшие, экзо- и эндотоксины микроорганизмов.

Антигенность — способность антигена вызывать образование антител и иммунный ответ. Степень иммунного ответа организма на различные антигены неодинакова, т. е. на каждый антиген вырабатывается неодинаковое количество антител.

Иммуногенность — способность создавать иммунитет. Это понятие применимо главным образом к микробным антигенам, обеспечивающим создание иммунитета к инфекционным болезням. Для того чтобы быть иммуногенным, антиген должен быть чужеродным в отношении данного реципиента и иметь молекулярную массу не менее 10 тыс. ЕД. С увеличением молекулярной массы иммуногенность нарастает. Корпускулярные антигены (бактерии, грибы, простейшие, эритроциты) более иммуногенны, чем растворимые. Среди растворимых большей иммуногенностью обладают высокомолекулярные, например агрегированные антигены.

Конъюгированные антигены — обобщенное название белков, которые приобрели новую антигенную специфичность благодаря присоединению к ним с помощью химической связи новой химической группировки.

Специфичность — особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Ее определяет антигенная детерминанта, т. е. небольшой участок молекулы антигена, который и соединяется с выработанным на него антителом. Число таких участков (группировок) у разных антигенов различно, и оно определяет число молекул антител, с которыми может соединяться антиген (валентность). От числа детерминант зависит валентность антигена: чем больше молекула, тем выше валентность.

Антигены подразделяют на полноценные и неполноценные. *Полноценные антигены* вызывают в организме синтез антител или сенсибилизацию лимфоцитов и вступают с ними в реакцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Для них характерна строгая специфичность, т. е. они вызывают в организме выработку специфических антител, вступающих в реакцию только с данным антигеном. *Неполноценные антигены*, или гаптены, представляют собой сложные углеводы, липиды и другие вещества, не способные вызывать образование антител в организме, но вступающие с ними в специфическую реакцию. Добавление к гаптенам небольших количеств белка придает им свойства полноценных антигенов. Белок, который укрупняет молекулу гаптена, получил название «шлеппер» (от нем. *schlepper* — проводник). К гаптенам относятся и гетерогенные антигены Форсмана, которые были описаны в 1911 г. Д. Форсман показал, что в органах животных разных видов (кошек, собак, лошадей, кур, морских свинок и др.) содержится общий антиген, но он отсутствует у человека, обезьян, кроликов, уток, крыс, т. е. это липоидная фракция, обладающая свойством гаптена.

По специфичности антигены животного происхождения подразделяют на видовые, групповые, органные и стадиоспецифичные.

Видовая специфичность характеризует антигены, свойственные только определенному виду животного, что используется при определении фальсификации мяса, групп крови с помощью антивидовых сывороток. *Групповая специфичность* характеризует антигенные различия животных по полисахаридам эритроцитов, белкам сыворотки крови, поверхностным антигенам ядерных соматических клеток. Антигены, обуславливающие внутривидовые различия индивидуумов или групп особей между собой, называют изо-антигенами, например групповые эритроцитарные антигены человека. *Органная (тканевая) специфичность* характеризует неодинаковую антигенность разных органов животного, например печень, почки, селезенка различаются между собой антигенами. *Стадиоспецифические антигены* возникают в процессе эмбриогенеза и характеризуют определенный этап внутриутробного развития животного, его отдельных паренхиматозных органов.

В некоторых случаях белки собственных тканей (сердца, печени, почек и др.) при взаимодействии с бактериальным белком, токсинами или ферментами бактерий, лекарственными веществами, под влиянием физических факторов (ожог, обморожение, облучение) изменяют свои физико-химические свойства и становятся чужеродными для организма — *аутоантигенами*. На эти антигены организм вырабатывает антитела, в результате чего возникают аутоиммунные болезни.

Антигены бактериальной клетки. Отдельные структуры микроорганизмов, экзо- и эндотоксины обладают свойством полноценных антигенов. Различают общие для родственных видов антигены — видовые и групповые, и антигены типоспецифические, свойственные определенному типу (варианту).

По расположению в микробной клетке различают антигены капсульные (у бактерий, образующих капсулы), поверхностные — антигены клеточной стенки (К-антигены), соматические (О-антигены) и жгутиковые (Н-антигены). Капсульные антигены лучше всего изучены у *E. coli*. Различают несколько поверхностных антигенов, входящих в состав К-антигена, которые обозначают латинскими буквами А, В и L. А-антиген — капсульный, В- и L-антигены — поверхностные клеточной стенки, по химическому строению представляют собой полисахариды и полипептиды.

Соматические О-антигены локализованы во внутреннем слое клеточной стенки и цитоплазматической мембране клетки и представляют собой липополисахаридо-полипептидный комплекс, обладающий специфичностью и иммуногенными свойствами. У грамотрицательных бактерий О-антиген является их эндотоксином. Соматический антиген термостабилен.

Жгутиковые Н-антигены присутствуют у всех подвижных бактерий. Это термолабильные белковые комплексы, обладающие у многих энтеробактерий двумя наборами детерминант — специфической (первой) и неспецифической (второй или групповой) фазами.

Экзотоксины большинства микроорганизмов обладают свойствами полноценных антигенов с выраженной неоднородностью в пределах вида и рода. Антигенными свойствами обладают также споры: они содержат антиген, общий вегетативной клетке, и споровый антиген.

Среди бактериальных антигенов выделяют так называемые *защитные* или протективные антигены. Антитела, синтезированные на эти антигены, защищают организм от заражения данным микробом. Протективными свойствами обладают капсульные антигены пневмококков, М-протеин стрептококков, А-протеин стафилококков, экзотоксин сибиреязвенной бациллы, белковые молекулы внутренних слоев стенки некоторых грамотрицательных бактерий и др. Очищенные протективные антигены не обладают пирогенными и аллергизирующими свойствами. Установлено, что в результате естественного отбора среди микробов возникают штаммы, у которых антигены сходны с антигенами организма человека и животных. При заражении такими микробами иммунная система на них не реагирует, так как лимфоциты их не распознают. Например, у стрептококков есть антигены, общие с антигенами тканей млекопитающих животных, в этом случае при заражении возбудитель будет беспрепятственно размножаться в организме и обусловит его гибель.

Антигены некоторых микробов обладают адгезивными свойствами. Природа адгезивности во многом еще не ясна. Помимо связи с определенными антигенными структурами отмечают такую с определенным набором ферментов (например, у холерного вибриона нейраминидазы, гиалуронидазы).

Все антигены (природные и искусственные) состоят из двух компонентов. Один из них представлен высокомолекулярным коллоидным веществом (белком), что определяет его антигенные свойства. Другой компонент состоит из аминокислотных остатков, полисахаридов или липидов, расположенных на поверхности белка. Он определяет специфичность антигена и называется *детерминантной группой*. Таким образом, в качестве детерминантной группы функционирует не вся молекула антигена, а только ее сравнительно небольшая часть, которая непосредственно реагирует с антителом. На поверхности антигена обычно располагается несколько детерминантных групп, обладающих одинаковой или близкой специфичностью, что обуславливает поливалентность антигена. Изучение специфичности антигенов и природы детерминантных групп имеет важное теоретическое и практическое значение. Изменяя детерминантную группу антигена, можно целенаправленно изменить его

специфичность, т. е. конструировать искусственные антигены с новой иммунохимической специфичностью.

Общие антигены у представителей различных видов микробов, животных и растений называют *гетерогенными*. Например, гетерогенный антиген Форсмана содержится в органах морской свинки, в эритроцитах барана и у сальмонелл. Гетерогенные антигены состоят из белков, липидов и углеводов; липиды и углеводы обуславливают их специфичность. Также они отличаются друг от друга по своему химическому составу.

Существование общих гетероантигенов у животных и паразитирующих в их организме микробов можно рассматривать как приспособление разных патогенных микробов к существованию в организме за счет общих антигенов. В результате подобной маскировки организм недостаточно активно отвечает на инфекцию, вызванную патогенными агентами, вследствие чего он остается перед ними незащищенным.

ФОРМЫ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ (ИММУННЫЙ ОТВЕТ)

Важнейшее свойство иммунной системы — способность различать множество собственных и чужих антигенных детерминант и давать на них дифференцированные и равнозначные ответы — обеспечивается соответствующим разнообразием молекул трех главных типов иммунологических рецепторов: антигенраспознающие иммуноглобулиновые рецепторы В- и Т-лимфоцитов и антигенпредставляющие рецепторы главного комплекса тканевой совместимости.

Различают пять форм специфических реакций, из которых складывается собственно иммунологическая реактивность:

- синтез антител;
- формирование иммунологической памяти;
- иммунологическая толерантность;
- гиперчувствительность замедленного типа;
- гиперчувствительность немедленного типа.

Лимфоциты обладают способностью «выбирать» определенную форму иммунного ответа на внедрение того или иного антигена. Этот выбор обусловлен следующими сложными процессами, происходящими в лимфоидной ткани: дифференцировка клеток, несущих иммунологическую функцию, и их межклеточные

кооперации. Клетки, обеспечивающие иммунный ответ, называют *иммунокомпетентными*. К ним принадлежат, как ранее упоминалось, Т- и В-лимфоциты и макрофаги.

В-лимфоциты — предшественники плазматических клеток (плазмобластов и плазмочитов), продуцентов иммуноглобулинов разных классов: М, G, А, Е, D. Субпопуляции Т-лимфоцитов различаются по своим функциям. Клетки-помощники кооперируются с В-лимфоцитами при образовании гуморальных антител против тимусзависимого антигена. Клетки-супрессоры регулируют активность специфического гуморального иммунного ответа, стимулируя или подавляя его. Эффекторные клетки клеточного иммунитета подразделяются на долго живущие клетки памяти и клетки-киллеры, или убийцы, обладающие цитотоксической активностью против чужеродных для организма клеток-мишеней и способные, выделяя разнообразные медиаторы иммунного ответа (лимфокины), стимулировать и вовлекать в борьбу против чужеродных антигенов различные клетки крови и системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) развивается также благодаря участию Т-лимфоцитов, активация которых антигеном сопровождается высвобождением из них лимфокинов. При контакте с антигеном В- и Т-лимфоциты, наиболее родственные по своей рецепторной структуре пространственной структуре антигена, превращаются в юные бластные формы, делятся и, таким образом, быстро обеспечивают потребность организма в реагирующих с данным антигеном Т- и В-лимфоцитах.

Для специфического иммунного ответа против большинства Т-зависимых антигенов необходимо взаимодействие (кооперация) различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (ИКК): Т- и В-лимфоцитов и макрофагов. Центральную роль в этой кооперации играют поверхностные антигены ИКК, кодируемые генами главного комплекса гистосовместимости. Взаимодействие клеток в иммунном ответе происходит следующим образом: проникший в организм антиген сам по себе, или чаще в виде иммунных комплексов с предсуществующими антителами, связывается с макрофагами с помощью имеющихся на них рецепторов для Fc-фрагментов антител. Взаимодействие макрофагов с иммунными комплексами активирует клетки, что

выражается в секреции макрофагами факторов, активирующих Т-клетки, называемых *интерлейкинами-1*, которые, в свою очередь, стимулируют Т-клетки-помощники, выделяющие факторы (в частности, В_HME — фактор репликации и созревания В-клеток), способствующие пролиферации и дифференциации В-лимфоцитов; В-лимфоциты размножаются и превращаются в антителосекретирующие клетки. Однако для функционирования последовательности макрофаг — Т-лимфоцит-помощник — В-лимфоцит необходимы определенные условия.

1. Т-лимфоцит-помощник, участвующий в кооперации, должен обладать антигенраспознающим рецептором против иммунной части антигена.

2. Т-лимфоцит-помощник должен уметь распознавать антигены на В-клетке и на макрофаге (кооперация эффективна только в случае их идентичности).

3. В-клетка при распознавании антигена связывается своим иммуноглобулиновым рецептором, распознающим антигена, с соответствующей антигенной детерминантой, которая, как правило, не совпадает с участком антигена, распознаваемым Т-клеткой.

Тем не менее механизм взаимодействия трех типов ИКК, который приводит к синтезу антител в результате действия антигенов, значительно сложнее. Так, Т-клетка-помощник, активирующая В-клетки, находится под контролем нескольких субпопуляций Т-клеток-супрессоров, которые, в свою очередь, контролируются по типу обратной связи факторами, образуемыми В-клетками и Т-клетками-помощниками. Супрессорные Т-клетки осуществляют отрицательную регуляцию Т-клеток-помощников, эффекторных Т-лимфоцитов, В-клеток и антителосекретирующих плазматических клеток. Они специфичны для данного антигена, угнетают пролиферацию и дифференциацию указанных выше клеток, тормозят их эффекторные функции (биосинтез антител и различных факторов).

Таким образом, разные субпопуляции Т-лимфоцитов, выделяя антигенспецифические и неспецифические факторы, осуществляют сложнейшую регуляцию ИКК или самостоятельно выполняют эффекторные, например цитолитические, функции в иммунитете.

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ. АНТИТЕЛА (ИММУНОГЛОБУЛИНЫ)

Защиту организма в течение первых 96 ч после инфицирования осуществляют неспецифические факторы естественной резистентности и раннего индуцибельного ответа. Примерно одновременно начинает развиваться собственно специфический иммунитет, представляющий собой заключительный и наиболее мощный этап защиты. Он включает в себя развитие протективного иммунитета и иммунологической памяти. Протективный иммунитет формируется с развитием гуморального и клеточного иммунного ответа. Сущность гуморального ответа заключается в образовании популяций В-лимфоцитов, синтезирующих специфические антитела.

Антитела — это специфические белки (иммуноглобулины), синтезируемые в организме определенным типом клеток под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться.

Антитела — важнейшие специфические факторы защиты организма против возбудителей инфекционных болезней и генетически чужеродных веществ. Они образуются в организме в результате естественного инфицирования, вакцинации живыми или убитыми вакцинами, контакта лимфоидной системы с чужеродными клетками или тканями (трансплантатами) либо с собственными аутоантигенами.

Первоначально антитела условно классифицировали по их функциональным свойствам на нейтрализующие, лизирующие и коагулирующие. К нейтрализующим были отнесены антитоксины, антиферменты и вируснейтрализующие лизины; к коагулирующим — агглютинины и преципитины; к лизирующим — гемолитические и комплементсвязывающие антитела. С учетом функциональной способности антител были даны названия серологическим реакциям: агглютинация, гемолиз, лизис, преципитация и др. Кроме того, антитела подразделены по физическим свойствам на тепловые, которые хорошо вступают в реакцию взаимодействия при температуре 37°C, и холодовые (криофильные), вступающие в реакцию при 4°C. По подвижности в электрическом поле белки сыворотки крови разделяются на альбумины и три глобулиновые фракции — α , β , γ . При помощи электрофореза удалось установить, что ан-

титела связаны только с бета- и гамма-глобулиновыми фракциями.

В дальнейшем для разделения антител применили метод высокоскоростного центрифугирования. Скорость седиментации белков измеряют в единицах Сведберга (S). В результате центрифугирования антитела были разделены на две основные группы:

- 1) 7S — небольшие молекулы антител;
- 2) 19S — большие молекулы антител.

После электрофореза антитела 7S в основном обнаруживаются в γ -глобулиновой фракции, а 19S — в β -глобулиновой.

Также было установлено, что антитела имеют различное количество активных центров в молекуле, которые определяют их валентность, именно поэтому они были разделены на полные и неполные. *Полные* (двух- и пятивалентные) антитела при взаимодействии с антигеном, в ответ на который они выработаны, дают визуально видимые реакции (агглютинации, лизиса, преципитации и др.). *Неполные* (моновалентные, блокирующие) антитела при специфическом взаимодействии с гомологичным антигеном не дают видимого проявления серологической реакции, т. е. не могут агрегировать частицы в крупные конгломераты, а лишь блокируют их. Неполные антитела образуются независимо от полных антител и выполняют те же функции. Представлены они различными классами иммуноглобулинов. Для обнаружения неполных антител существуют специальные реакции — Кумбса, блокирующая проба и др.

Следует отметить, что при поступлении антигена в организм могут образовываться антитела с различной функциональной активностью (преципитины, агглютинины, лизины и др.). Все они идентичны, различно лишь их действие. Точное число возможных антител неизвестно, предполагают, что их не менее 10 тыс.

В соответствии с Международной классификацией сывороточные белки, несущие «антительную» активность и называвшиеся ранее гамма-глобулинами, получили название *иммуноглобулинов* и обозначаются символом Ig. Иммуноглобулины подразделяют на классы, а в пределах каждого класса на подклассы. Известно пять классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgD, IgA, IgE. У отдельных классов существуют подклассы.

Моноклональные антитела. Во многих исследованиях, связанных с изучением патологии животных, используют антитела,

специфически реагирующие с антигеном. Известно, что иммунная система организма вырабатывает специфические антитела на огромное множество антигенов. В основе такой способности лежит наличие большого разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа с узкой специфичностью. Например, общее число клонов у мышей достигает 10^7 – 10^{10} . В ответ на данный антиген в реакцию вовлекается множество клонов, что обуславливает высокую гетерогенность синтезируемых антител. Так, при иммунизации комплексом гаптен-белок образуется до 8 тыс. различных антител. Спектр вырабатываемых антител изменяется в ходе иммунного ответа, он различен и у разных видов животных. Поэтому при использовании антисывороток для идентификации и количественного определения антигенов возникает проблема неспецифического связывания и перекрестной реакции антител.

Многие исследователи пытались получить антитела с узкой специфичностью. Например, бактериальные полисахариды в определенных условиях дают антитела с высокой специфичностью. В 1975 г. Д. Кехлер и Ц. Милстейн предложили принципиально новый подход к получению гомогенных антител — метод гибридом. С его помощью производят слияние плазматитомы (опухоловой клетки, возникшей из антителообразующих клеток) с клетками селезенки иммунизированного животного. Таким образом получают гибридные клетки (гибридомы), способные неограниченно размножаться и синтезировать антитела узкой специфичности (моноклональные антитела). Следует подчеркнуть, что моноклональные антитела, обладая высокой специфичностью, могут не обнаруживать некоторые антигенные детерминанты у родственных микроорганизмов, а также исключают участие комплемента в реакции «антиген — антитело», иммунной преципитации. Поэтому в ряде случаев целесообразно использовать поликлональные сыворотки.

Процесс получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы: иммунизация животных; подготовка клеток к слиянию; слияние; отбор клонов, продуцирующих антитела; клонирование и реклонирование; накопление гибридомных клеток; получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела; выделение антител.

Получение гибридом возможно при соблюдении специальных условий: стерильность и наличие соответствующих реактивов и питательных сред для культивирования клеток. При этом антиген должен быть достаточно очищенным для иммунизации, так как организм вырабатывает антитела на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала, что значительно осложняет отбор клонов, продуцирующих антитела к интересующей антигенной детерминанте. Методы иммунизации организма постоянно совершенствуются. Для этого используют культуры лимфоцитов, выращенные в суспензии, или же лимфоциты культивируют в маленькой камере на диализной мембране, через которую происходит обмен питательных веществ, поступающих из небольшого резервуара (Д. Марбрук, 1967).

После слияния и отбора гибридомных клеток, продуцирующих антитела, осуществляется клонирование с целью выделения стабильных клеточных линий. Для этого используют метод лимитирующих разведений в полужидком агаре. После отделения клонов клеток, синтезирующих антитела, их размножают в достаточном количестве и замораживают. Для получения больших количеств моноклональных антител отдельные образцы размножают *in vitro* в монослое, или в суспензии в реакторах, или же гибридомные клетки вводят в организм животных и в результате получают от них асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела. Их широко используют для диагностики инфекционных болезней животных и человека бактериальной и вирусной этиологии. Например, получены антитела против возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза, листериоза, ящура, бешенства, классической чумы свиней, болезни Ауески и др. Важно подчеркнуть, что использование моноклональных антител в радиоиммунном или иммуноферментном анализе резко повышает чувствительность и специфичность реакции.

Перспективно использование моноклональных антител для определения стельности коров по содержанию прогестерона в молоке. Для этих целей получают моноклональные антитела на прогестерон, связанный через янтарную кислоту с бычьим альбумином. Эти антитела применяют для обнаружения прогестерона в молоке методом иммуноферментного анализа. Компонентами реакции пропитывают фильтровальную

бумагу, на которую затем наносят каплю исследуемого молока, и через несколько минут определяют уровень содержания прогестерона по изменению цвета фильтровальной бумаги.

Моноклональные антитела могут быть использованы при получении вакцины генно-инженерным методом. Уже созданы такие вакцины против вируса синего языка, бруцеллеза, болезни копыт у овец, кокцидиоза. Например, вакцина против кокцидиоза готовится путем клонирования генов возбудителя *Eimeria tenella*, которые кодируют образование белковых антигенов. В результате клонирования таких генов возможно получение индивидуальных белков возбудителя в значительных количествах, что дает возможность использовать их для вакцинации. Такие белки не обладают инфекционностью, стоимость их невелика. Компания «Геникс» (США), разработав клонирование генов *E. tenella* и добившись их экспрессии в клетках *E. coli*, показала, что полученные белки-антигены при введении их курам вызывают частичный иммунитет к кокцидиозу.

Моноклональные антитела могут служить в качестве лечебного средства при злокачественных опухолях: для этого применяют моноклональные антитела против специфического антигена раковых клеток или возбудителя злокачественного перерождения тканей. Научные исследования в этой области проводятся очень интенсивно, и можно надеяться, что моноклональные антитела займут достойное место среди противоопухолевых лечебных средств.

Активный центр антител. Взаимодействие антител с антигеном. Антитела способны реагировать с антигеном благодаря наличию у них определенных структур, которые называют *активным центром*. Он представляет собой полость или щель, соответствующую пространственной конфигурации детерминантной группы антигена. Последняя же определяется последовательностью аминокислот переменных участков легких и тяжелых цепей антитела. Активный центр, куда входит определенной формы и жесткости детерминантная группа, должен быть ей комплементарен, без чего не наступит феномен серологической специфичности. Молекулы антител различных классов различают по валентности, т. е. по количеству у них активных центров. Так, IgG и IgA бивалентны (обладают двумя активными центрами), IgM поливалентен — может свя-

зять 5–10 молекул антигена, так как обладает 10 активными центрами.

Молекула антитела связывается с детерминантой антигена не целиком, а лишь определенной частью — активным центром. Предполагают, что соединению антигена и антитела способствуют следующие силы: гидрофобное взаимодействие, водородные связи, кулоновы силы между группами ионов с противоположным зарядом, вандерваальсовы силы, которые действуют на очень близком расстоянии.

Активность связывания антител с антигеном оценивают по аффинитету и авидности. *Аффинитет* характеризует уровень сродства антитела к испытуемому антигену, степени совпадения (комплементарности) конфигураций активного центра антитела и антигенной детерминанты (подобно ключу в замочной скважине). Под *авидностью* понимают количество (валентность) и расположение активных центров, характеризующие «жадность» связывания с антигеном всей молекулы антитела. Чем выше авидность иммунной сыворотки, тем слабее склонность агрегатов к диссоциации. Отмечено, что один и тот же антиген вызывает образование антитела с различным уровнем аффинитета и авидности. Высокоаффинные антитела образуют более прочные комплексы с антигеном, чем низкоаффинные. Авидность зависит как от аффинности, так и от валентности, приходящейся в среднем на одну молекулу антител. При равной аффинности авидность IgM больше, чем авидность IgG, поскольку IgM функционально пентавалентен, а IgG двухвалентен.

РЕАКЦИЯ «АНТИГЕН – АНТИТЕЛО», ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Знание механизмов взаимодействия антигенов с антителами раскрывает сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных агентов. Механизм реакции антигена с антителом объясним на основе современных представлений о наличии у антигенов нескольких детерминантных групп и двух активных центров в молекуле антитела. Детерминантные группы антигена несут электрический заряд. В процессе индукции синтеза антител они, так или иначе, определяют

специфичность формирующихся антител. Концевые части полипептидных цепей имеют заряд, противоположный заряду детерминантной группы антигена. Полярные группы антигена и антитела, обладающие противоположными зарядами, соединяются между собой. Прочность образовавшегося комплекса зависит от количества реагирующих групп и полноты совпадения структуры полярных групп антигена и антитела. Чем больше реагирующих групп и полнее совпадение структуры полярных групп, тем прочнее соединение, и наоборот.

При оптимальном соотношении антигена с антителом происходит полное взаимное насыщение всех валентностей, и образуются прочные комплексы, выпадающие в осадок. При избытке антител часть активных центров остается свободной, и образование комплекса задерживается. В случае избытка антигена возникают рыхлые комплексы, и замедляется выпадение осадка. При максимальном избытке антигена, когда связаны все активные центры антитела, образование комплексов прекращается и осадок не выпадает. Специфичность антител, обуславливающая механизм их взаимодействия с антигеном, связана с конфигурацией активных центров, которые должны строго соответствовать детерминантным группам антигена.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии, первая — *специфическая* (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой), вторая — *неспецифическая*, когда отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс «антиген — антитело» выпадает в осадок. Неспецифическая стадия, как правило, возможна в присутствии растворов электролитов и визуально проявляется по-разному в зависимости от физического состояния антигена. Если антигены корпускулярные, то может появиться феномен *агглютинации* — склеивания различных химических частиц, сенсibilизированных антигенами, и клеток, в том числе микроорганизмов. Образующиеся конгломераты выпадают в осадок, при этом микробные клетки морфологически заметно не меняются: теряя подвижность, они остаются живыми. Антитела, участвующие в реакции агглютинации, называют *агглютинидами*, антигены — *агглютиногенами*, а образующийся агрегированный комплекс — *агглютинатом*. Поскольку антигенная структура микробов разнообразна, в их агглютинации принимают участие

антитела разной специфичности. Тожественность детерминантных участков антигенов микробов разных видов обеспечивает групповые реакции агглютинации с гетерологичными иммунными сыворотками.

Когда в реакции с антителами участвуют растворимые (молекулярные) антигены — белки или их комплексы с углеводами и липидами разного происхождения, бактериальные экстракты, лизаты и фильтраты бульонных культур, наблюдается феномен преципитации — осаждение антигена. Образующийся осадок носит название *преципитата*, антитела — *преципитинов*, а антигены — *преципитиногенов*.

Реакция, происходящая между антителами и антигеном и начинающаяся быстрым соединением детерминантной группы антигена со специфическим активным центром антитела (I стадия), осложняется далее образованием длинных цепей из чередующихся молекул антигена и антител, а также разветвлением этих цепей (II стадия). Во II стадии реакции происходит образование решетки «антиген — антитело».

Необходимое условие для образования решетки — наличие более трех антигенных детерминант на каждую молекулу антитела. Существует несколько вариантов соединения молекул антител с молекулами антигена. Молекулы антигена представляют собой узлы решетки, а молекулы антител — связующие звенья. В зоне избытка антител часть антигенсвязывающих участков свободна и формирование комплекса приостанавливается. Область оптимальных соотношений (зона эквивалентности) концентраций антигена и антител — это отсутствие свободных антиген и свободных антител в надосадочной жидкости после образования осадка. В зоне избытка антигена комплекс «антиген — антитело» растворяется, так как свободные и связанные в решетку молекулы антигена конкурируют между собой за двухвалентные молекулы антител, в результате чего решетка распадается на ряд растворимых комплексов.

Окончательное формирование системы «антиген — антитело» протекает намного медленнее, чем I стадия реакции. Это неспецифический процесс, в который могут включаться различные посторонние белки, захватывающиеся решетчатой структурой «антиген — антитело» и неспособные диффундировать сквозь узкие петли этой решетки в надосадочную жидкость.

Скорость образования решетки зависит от температуры, ионной силы раствора и других условий. Оптимальные условия для реакции «антиген — антитело» *in vitro* следующие: температура 0–37°C; ионная сила 0,005–0,1 и рН 6,4–8,6.

Механизм реакций преципитации и агглютинации, при которых иммунный комплекс выпадает в осадок, вполне объясняет теория решетки. В ходе реакции преципитации решетка формируется непосредственно в растворе, а при агглютинации бактериальных клеток решетка «антиген — антитело» образуется на самих клетках. О характере соединения антигена с антителом судят, применяя различные методы. Метод изучения активного центра (метка по родству), основанный на реакции гаптена со специфическими антидетерминантами, выявляет пептидные цепи, участвующие в построении активного центра антител. Методом рентгеноструктурного анализа была раскрыта структура активного центра антител, формирующаяся из гипервариабельных участков вариабельных доменов. При этом не было получено прямых данных, указывающих на изменение формы активного центра после присоединения к нему антигена. Электронная микроскопия — один из важнейших методов не только изучения общей конформации молекул иммуноглобулинов, но и исследований комплексов антител с антигенами. Этим методом было выяснено, что комплексы «антиген — антитело» имеют кольцеобразную, перекрывающуюся или решетчатую структуру.

Антитела класса IgG образуют с антигеном, как правило, кольцеобразные комплексы. Электронные микрофотографии иммунных комплексов, образованных при помощи «антиген — антитело», интерпретировать сложно. Однако в некоторых случаях удается различить циклические комплексы, похожие на веревочную лестницу, и пропеллерообразные структуры.

Реакции взаимодействия «антиген — антитело». Реакции между антигенами и антителами *in vitro*, имеющие диагностическое значение, называли *серологическими* (от лат. *serum* — сыворотка), так как источником антител служила сыворотка крови. При появлении методов иммунохимического анализа серологические реакции стали одними из широкого набора реакций, выявляющих механизмы взаимодействия между антигенами и антителами. Если на разных этапах развития имму-

нологии в качестве антител для постановки серологических реакций использовали только сыворотку крови, теперь благодаря разнообразным методам выделяют из нее высокоочищенные иммуноглобулины. Для индикации и количественной оценки того или иного вещества антигенной природы предложены способы получения высокоспецифичных (моноспецифичных) антител и высокочувствительные методы регистрации концентрации отдельных компонентов реакции «антиген — антитело». Это стало возможным в связи с разработкой способов конъюгирования антигенов и антител с флуоресцирующими красителями и ферментами, введения компонентов реакции «антиген — антитело» на различных типах носителей. Достижения современной иммунохимии позволили проводить реакции «антиген — антитело» на уровне, который вряд ли можно назвать серологическим, хотя источником антител продолжает оставаться сыворотка крови. Понятие «серологическая реакция» окончательно отпадает, когда речь заходит о взаимодействии антигена с моноклональными антителами, получаемыми благодаря разработке гибридомной техники, и когда реакция «антиген — антитело» протекает при аллергии.

Антитела в зависимости от свойств антигена и условий взаимодействия с ним обладают нейтрализующим, иммобилизующим, коагулирующим (осаждающим) и лизирующим (растворяющим) действиями. Нейтрализующее действие проявляется в реакциях нейтрализации токсина антитоксином; иммобилизующее — в иммобилизации некоторых микроорганизмов; коагулирующее — в реакциях агглютинации и преципитации; лизирующее — в реакциях лизиса и связывания комплемента. Каждая из разновидностей серологических реакций имеет свои варианты, а их постановка — различные модификации, поэтому методические подходы к проведению реакций между антигеном и антителом довольно разнообразны.

Реакция нейтрализации (РН). В ходе реакции нейтрализации специфические антитела нейтрализуют токсическое действие антигена, которое проявляется при попадании последнего в организм. Если антигеном служит микробный экзотоксин (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.), то специфические антитела нейтрализуют его. В организме происходит нейтрализация только свободного, не связавшегося с клетками

токсина. Обезвреживание токсина в ходе физико-химической реакции нейтрализации происходит за счет связывания его свободных аминок групп, что приводит к потере токсичности. Если антигеном служит вирусный материал, нейтрализующие антитела полностью подавляют специфическую активность вируса, выявляемую в различных клеточных культурах, куриных эмбрионах и на подопытных животных. Вирус перестает размножаться, теряет свою инфекционность.

Реакции агглютинации (РА). Различают прямую и непрямую, или пассивную, агглютинации. В прямой в качестве антигена выступает сама микробная клетка или структурные компоненты ее поверхностной оболочки. Предел чувствительности реакции агглютинации микробов составляет 0,01 мкг азота белка антител в 1 мл.

Агглютинация обусловлена в большей степени особенностями строения клеточной оболочки и ее функциями, нежели свойствами агглютининов. Fab-фрагменты антител могут блокировать антигенные детерминанты, не приводя непосредственно к склеиванию. Агглютинации способствует расположение антигенных рецепторов клеточной поверхности в виде скоплений.

При пассивной агглютинации растворимые антигены (белки, полисахариды и их комплексы микробного происхождения) соединяются с нерастворимым носителем, выполняющим исключительно индикаторную функцию. Носителями могут быть эритроциты, частицы латекса, полиакриламида, бентонита и др. Связывание антигена с носителем происходит в результате адсорбции или химического взаимодействия. Микробные полисахариды, например, адсорбируются на нативных эритроцитах без какой-либо их предварительной обработки. Различные белки (в том числе микробные фрагменты) можно присоединить к эритроцитам, но только после обработки различными химическими веществами, обладающими дубильным действием, — танином, хромахлоридом, формальдегидом или бисдиазотированным бензидином. Такая обработка предотвращает разрушение эритроцитов, которое может произойти при непосредственном контакте с антигеном. При условии, если антиген, связанный с носителем, соответствует антителу, происходит агглютинация.

Реакция преципитации (РП). Реакция «антиген — антитело» представлена преципитацией. Она основана на осаждении

антигена из раствора специфическими антителами. Комплекс «антиген — антитело» выпадает в осадок только при определенных соотношениях концентраций реагирующих молекул. Область этих соотношений, при которых в надосадочной жидкости после образования преципитата не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, называется *зоной эквивалентности*. Вне данной зоны при избытке антител или антигена феномен преципитации не происходит, так как образуется растворимый комплекс «антиген — антитело». Реакция преципитации менее чувствительна, чем реакция агглютинации.

Существуют модификации реакции преципитации. Самый простой способ постановки — *кольцепреципитация*, которую выполняют в пробирках путем наслаивания на иммунную сыворотку различных разведений прозрачного исследуемого антигена. На границе двух реагирующих систем через определенное время появляется опалесцирующее серо-белое кольцо преципитации. Именно таким образом при изучении стерильных фильтратов бульонных культур возбудителей холеры, брюшного тифа, чумы, сибирской язвы и соответствующих антисывороток в конце в 1897 г. были обнаружены преципитины.

Реакция преципитации может быть поставлена в агаровом геле (иммунодиффузия по Ухтерлони). Принцип этого метода заключается в следующем: растворимые антигены и антитела вносят в лунки, вырезанные в геле на определенном расстоянии. Компоненты реакции диффундируют в слое агара навстречу друг другу, образуя в зоне контакта преципитат в виде мутной видимой линии преципитации.

Для более детальных иммунологических исследований применяют метод иммуноэлектрофореза, предложенный в 1953 г. П. Грабаром и К. А. Уильямсом. Вначале осуществляют электрофоретическое разделение антигена, представляющего собой зачастую смесь белковых или других молекул в забуференном агаровом геле. После разделения в канавку, которая идет в направлении миграции антигенных веществ, вносят преципитирующую сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и на месте их взаимодействия появляются дугообразные серо-белые линии преципитации. По числу, положению и форме этих линий дают заключение о составе исходной смеси антигенов.

Реакция лизиса (РЛ). Лизирующее (растворяющее) действие антител наглядно проявляется в реакциях лизиса и связывания комплемента. В их основе лежит взаимодействие корпускулярных антигенов со специфическими антителами. Иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты, из которых выходит гемоглобин, и реагирующая смесь из мутной взвеси эритроцитов преобразуется в прозрачную красную жидкость, так называемую лаковую кровь. Реакция названа *реакцией гемолиза*. Когда иммуноглобулины также при содействии комплемента разрушают оболочку бактериальной клетки, наблюдается лизис бактерий — бактериолизис.

Реакция связывания комплемента (РСК). Механизм действия наиболее сложный по сравнению с другими серологическими реакциями. В РСК участвуют две системы «антиген — антитело». Для визуальной регистрации связывания комплемента основной системой «антиген — антитело» в реакцию дополнительно вводят вторую, или индикаторную, систему, состоящую из взвеси эритроцитов и соответствующей антисыворотки (гемолитической сыворотки). Если основной комплекс «антиген — антитело» связал на себе комплемент (в случае соответствия антигена антителу), то гемолиз отсутствует и РСК дает диагностически положительный ответ. Если в основной системе антиген и антитело неспецифичны друг другу, то комплемент остается свободным и фиксируется на втором индикаторном комплексе, вызывая гемолиз эритроцитов, и РСК дает диагностически отрицательный ответ. По чувствительности РСК примерно соответствует реакции пассивной гемагглютинации.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). В основу данного метода положено взаимодействие антигена с антителом, при котором один из компонентов реакции (чаще антитело) обладает способностью к вторичной флуоресценции благодаря предварительному соединению с флуоресцентным красителем. Образовавшиеся таким образом иммунные комплексы становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами на темном фоне под флуоресцентным микроскопом. В качестве флуоресцентных красителей используют флуоресцеин, родамин, В-изотиоцианат, лисам-мин-родамин и другие, имеющие реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианат и др.), которые

соединяются со свободными аминокетильными группами молекул антител, не теряя при обработке флуорохромами специфического связывания с соответствующим антигеном.

Существует два флуоресцентных метода: прямой и непрямой. *Прямой* метод основан на непосредственном специфическом соединении антигена с мечеными антителами. *Непрямой* метод — на поэтапном выявлении комплексов «антиген — антитело» с помощью флуоресцентных красителей. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена (например, бактериальной клетки) со специфическими антителами (иммуноглобулинами) иммунной сыворотки. Второй этап — в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым антииммуноглобулином.

Обнаружение иммуноглобулинов иммунофлуоресцентным методом возможно, если антиген, использованный *in vitro* для образования антител, представляет собой растворимый белок. В этом случае он может быть конъюгирован с флуорохромом и в таком виде использоваться для обнаружения гомологичных антител.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В основу данного метода положена конъюгация антитела или гаптена с ферментом, которая не приводит к утрате антителом или гаптенем специфичности, а ферментом — каталитической активности. Однако в составе комплекса «антиген — антитело» конъюгаты гаптен-фермент или антитело-фермент теряют свою каталитическую активность.

Соединение молекул антигена с ферментом осуществляется с помощью глутаральдегида — бифункционального реагента, взаимодействующего с ϵ -аминогруппами белковых молекул. В качестве фермента успешно применяют, в зависимости от модификации метода, либо пероксидазу, β -галактозидазу, либо щелочную и кислую фосфатазы (реже ацетилхолин, глюкоамилазу). Используемый для маркировки антител фермент не должен присутствовать в исследуемых клетках, содержащих антиген.

Иммуноферментные методы первоначально были разработаны для гистохимических исследований. Принцип иммуногистохимического анализа с использованием ферментов заключается в следующем: антитела, маркированные ферментом,

соединяются со специфическим антигеном, фиксированным на твердом носителе (полистироловая пластина или другие непористые полимеры), образуя невидимый комплекс. Выявление иммунных комплексов, содержащих фермент, проводится с помощью цветной реакции, происходящей при добавлении ферментспецифического субстрата. Окрашенный комплекс «антиген — антитело» выявляется в световой или электронной микроскопии.

В дальнейшем методы иммуноферментного анализа стали применять для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. Были созданы гетерогенные (твердофазные) и гомогенные методы, принципиально отличающиеся способом разделения компонентов иммунохимической реакции. Гомогенный метод характеризуется протеканием реакции «антиген — антитело» в гомогенном растворе, и этап физического разделения реагентов и продуцентов реакции не обязателен. Твердофазные методы основаны на применении антител (или антигенов), иммобилизованных на нерастворимых носителях, гомогенные методы — на эффекте модуляции антителами активности фермента, связанного с антигеном. В основу гомогенных методов положен принцип конкурентного взаимодействия меченого и немеченого гаптена с активными центрами антител. Чем больше свободного гаптена введено в реакцию до прибавления меченого гаптена, тем меньшее количество последнего будет связано с антителами. Соответственно и ферментативная активность в растворе изменится незначительно. Наоборот, чем меньше свободного гаптена ввести в реакцию, тем большее количество ковалентного соединенного с ферментом гаптена уйдет в иммунный комплекс, а ферментативная активность в растворе существенно понизится.

Определение неизвестной концентрации гаптена в образце осуществляют по заранее выведенной калибровочной кривой, для построения которой устанавливают зависимость активности фермента в данной системе от стандартных концентраций свободного гаптена.

В твердофазном иммуноферментном анализе наряду с конкурентными методами распространены подходы, основанные на последовательном взаимодействии фиксированных на носителе иммуноглобулинов с антигеном (или наоборот), а затем с

иммуноферментным конъюгатом, представляющим собой меченные ферментом антитела против иммуноглобулинов (сэндвич-метод, от *англ.* sandwich — бутерброд).

В *радиоиммунологическом анализе* (РИА) специфичность реакции «антиген — антитело» сочетается с высокой чувствительностью, обеспечиваемой применением радиоактивной метки, благодаря которой можно определить количество азота антител до 10^{-8} мг/мл. Для проведения анализа необходимо иметь антисыворотки и гомологичные антигены, маркированные как-либо изотопом йода (^{125}I , ^{131}I), равно как и гаптены, маркированные ^{14}C или ^3H . Чувствительность метода существенно возрастает при использовании высокоаффинных антител с низкой перекрестной реактивностью и антигенов с высокой удельной радиоактивностью. В основу радиоиммунологического анализа положен принцип конкурентного взаимодействия определяемого немеченого и известного количества меченого антигена с активными центрами антител. При этом происходит вытеснение меченого антигена или гаптена из его комплекса с антителом вследствие последующего добавления больших концентраций немеченого антигена или гаптена той же специфичности. Реакция (при высоком разведении ингредиентов) подчиняется закону действующих масс: происходящее вытеснение пропорционально введенному количеству немеченого антигена или гаптена. Конкуренцию между определяемым и меченым антигенами можно оценить количественно с помощью радиометрии, предварительно отделив образовавшиеся иммунные комплексы от несвязавшегося меченого антигена. Концентрацию определяемого антигена рассчитывают, исходя из сравнения соотношений свободного и связанного меченых реагентов с соответствующим стандартом.

КЛЕТочНЫЕ ФАКТОРЫ (КЛЕТочНЫЙ ИММУНИТЕТ)

Все иммунные реакции на попавший в организм антиген выполняют функцию специфически сенсibilизированных клеток лимфоидного ряда. Установлены особые иммунологические реакции, не связанные с антителами, а свойственные только иммунокомпетентным клеткам. Эту форму реакции из-за особенностей клеточного иммунного ответа принято называть

клеточным иммунитетом (от *англ.* — cell immunity). Наиболее яркое его проявление — повышенная чувствительность замедленного типа, в основе которой лежит действие не антител, а эффекторных элементов клеточного порядка. Термин «повышенная чувствительность замедленного типа» принято использовать как синоним понятия «клеточный иммунитет».

Специфический клеточный иммунитет включает в себя образование популяции антигенспецифических Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа, обладающих способностью специфически распознавать антиген, вызвавший их появление, взаимодействовать с ним и выполнять при этом различные эффекторные функции.

Иммунологическая память. Способность иммунной системы организма быстрее и интенсивнее реагировать на повторное введение антигена называется иммунологической памятью. После первичного ответа на антиген в организме образуется определенное количество долгоживущих клеток памяти, сохраняющих информацию об антигене, — это Т- и В-клетки памяти. Их характерной особенностью является быстрая пролиферация под влиянием специфического антигена с образованием большой популяции клеток-эффекторов и синтезом соответственно большого количества антител и цитокинов. Она лежит в основе поствакцинального иммунитета и представляет собой высокоэффективную защиту организма от реинфекции. Таким образом, иммунологическая память приобретается в процессе жизни и не передается по наследству, т. е. присуща только данному индивиду.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Иммунологическая толерантность (отсутствие иммунного ответа, иммунная ареактивность) — индуцированное подавление иммунного ответа, вызванное предварительным введением конкретного антигена. О ее наличии судят на основе следующих критериев: отсутствие или уменьшение образования антител на обычный антигенный стимул; неспособность организма отторгнуть трансплантат аллогенной ткани; неспособность организма ликвидировать вирусную инфекцию; отсутствие обычной тканевой реакции на разрешающую дозу антигена после предварительной сенсibilизации.

Различают естественную и приобретенную иммунологическую толерантность. *Естественная* возникает при встрече с антигеном в период эмбрионального развития. Например, плод, рожденный от больных бруцеллезом животных, становится толерантным к бруцеллам во взрослом состоянии. В 1945 г. Р. Оуен подметил, что у неидентичных разнояйцевых телят-близнецов плаценты часто сливаются и осуществляется общее кровообращение. У таких телят в течение всей жизни в крови циркулируют эритроциты обоих животных и возможны успешные пересадки кожных лоскутов. В 1953 г. М. Гашек путем создания общего кровообращения двух куриных эмбрионов вывел цыплят, эритроциты которых при введении друг другу не вызывали выработки на них антител. В том же году П. Медовар вместе с сотрудниками воспроизвел феномен толерантности на мышцах двух линий. Для этого селезеночные клетки мышцей одной линии ввели в эмбрионы другой линии. Родившиеся и выросшие мыши не отторгали трансплантат от доноров. Следовательно, если незрелая иммунная система постоянно контактирует с данным антигеном, он признается как «свой». Именно этим можно объяснить тот факт, что отсутствие иммунного ответа на свои собственные антигены является нормой.

Приобретенная иммунологическая толерантность может быть индуцирована в течение некоторого времени постнатальной жизни. Этот период назван *адаптивным*. Например, у овец и кроликов адаптивный период заканчивается до рождения. У мышей, крыс, собак, кур, уток, индеек адаптивный период продолжается в течение нескольких дней после рождения: у кур, индеек, мышей — 1–2 сут.; у собак, уток — 2–5 сут.

Иммунологическую толерантность можно создать и у взрослых животных при условии введения им больших или малых доз антигена. Некоторые исследователи обращают внимание на возможность возникновения иммунологической толерантности при вакцинации животных в период беременности либо при вакцинации несколько раз в короткий промежуток времени. Продолжительность состояния толерантности связана с персистенцией антигена в организме; с элиминацией антигена организм теряет к нему толерантность.

Для ветеринарной практики важное значение имеет внутриутробное заражение, особенно вирусами. В этих случаях наряду

с инфекционными абортами могут рождаться животные, устойчивые к данному возбудителю, чаще к вирусу. У таких животных нет противовирусных антител, и они продолжительное время могут быть источником инфекции, например чумы свиней. Механизм развития толерантности до конца не выяснен. Считают, что толероген (антиген) индуцирует образование клона Т-супрессоров, которые непосредственно реагируют с Т-хелперами или с предшественниками плазматических клеток, блокируя их активность.

ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Иммунопатология изучает патологические реакции и болезни, развитие которых обусловлено иммунологическими факторами и механизмами. Ее объектами являются разнообразные нарушения способности иммунокомпетентных клеток организма различать «свое» и «чужое», собственные и чужеродные антигены. Экспериментным путем были установлены многочисленные факты повреждающего воздействия иммунных механизмов (антител и сенсibilизированных лимфоцитов) органов и клеток хозяина при ряде инфекционных болезней. Таким образом, иммунный ответ в связи с измененной реактивностью иммунокомпетентных клеток может иметь характер противоположный защитному. Иммунопатология включает в себя три типа реакций: реакция на собственные антигены, когда иммунокомпетентные клетки распознают их как чужеродные (аутоиммуногенные); патологически сильно выраженная иммунная реакция на аллерген; снижение способности иммунокомпетентных клеток к развитию иммунного ответа на чужеродные вещества (иммунодефицитные заболевания и др.).

Установлено, что при некоторых болезнях наступает распад тканей, сопровождающийся образованием в больном организме «собственного» чуждого антигена. Антитела, продуцируемые против собственных антигенов, называют *аутоанти телами*, а такого рода антигены — *аутоантигенами*.

Аутоантигенами служат компоненты собственных тканей, возникающие в результате воздействия микроорганизмов, физико-химических факторов, особенно ионизирующего излучения.

Причиной возникновения аутоиммунных реакций может послужить введение в организм микробов, обладающих общими

антигенами с тканями животного. В этих случаях макроорганизм, отражая анализ чужеродного антигена, попутно отражает компоненты собственных тканей ввиду общности антигенных детерминант микро- и макроорганизма. Считается признанным, что явления аутоиммунитета наступают при гиперпродукции антител, гиперфункции и снижении функции Т-клеток. Дефицит последних, по-видимому, нарушает их контроль над функцией В-клеток.

Аллергия (от *греч.* alios — другой, ergon — действие) — измененная реактивность, или чувствительность, организма по отношению к тому или иному веществу, чаще при повторном поступлении его в организм. Термин «аллергия» применил австрийский ученый К. Пирке в 1906 г. для обозначения измененной реактивности организма. Все вещества, изменяющие реактивность организма, он предложил назвать *аллергенами*. Ими могут быть различные вещества животного или растительного происхождения, липоиды, сложные углеводы, лекарственные вещества и др. В зависимости от типа аллергенов различают инфекционную, пищевую (идиосинক্রазия), лекарственную и другие аллергии. Аллергию следует рассматривать как компонент приобретенного иммунитета, поскольку она проявляется благодаря включению факторов специфической защиты и развивается, как и все другие иммунные реакции, в ответ на проникновение аллергена в организм. Реакции эти могут быть повышены по сравнению с нормой — гиперергия, могут быть понижены — гипоергия или полностью отсутствовать — анергия.

Аллергические реакции подразделяют по проявлению на *гиперчувствительность немедленного типа* (ГНТ) и *гиперчувствительность замедленного типа* (ГЗТ). ГНТ возникает после повторного введения антигена (аллергена) спустя несколько минут; ГЗТ проявляется спустя несколько часов (12–48), а иногда и дней. Оба типа аллергии отличаются не только быстротой клинического проявления, но и механизмом их генеза. ГНТ обусловливается антителами, и в основе их генеза лежит реакция «аллерген — антитело». ГЗТ характеризуется отсутствием циркулирующих в крови антител и возможностью передачи гиперчувствительности нормальному организму с помощью сенсибилизированных Т-лимфоцитов. К ГНТ относят анафилактику, атопические реакции и сывороточную болезнь.

Анафилаксия (от греч. ана — против, phylaxia — защита) — состояние повышенной чувствительности сенсibilизированного организма на повторное парентеральное введение чужеродного белка. Анафилаксия была открыта П. Портье и Ш. Рише в 1902 г. Первая доза антигена (белка), вызывающая повышенную чувствительность, называется *сенсibilизирующей* (от лат. sensibilitas — чувствительность), вторая доза, после введения которой развивается анафилаксия, — *разрешающей*. Сенсibilизирующую дозу вводят животным подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно; разрешающую — внутривенно, внутрисердечно, внутримышечно, причем разрешающая доза должна в несколько раз превышать сенсibilизирующую. Состояние повышенной чувствительности у животных развивается спустя 10–20 сут. Клиническая картина анафилаксии у животных разных видов неодинакова. Наиболее демонстративно ее проявление у морских свинок. Если предварительно сенсibilизированной морской свинке подкожно ввести 0,01 мл лошадиной сыворотки и через 10–20 сут. внутривенно ввести 0,1–0,5 мл такой же сыворотки, то через несколько минут развивается картина анафилактоического шока. Морская свинка начинает беспокоиться, чешет лапками нос, шерсть взъерошивается, появляется резкая одышка, происходит непроизвольное выделение мочи и кала, возникают тонические и клонические судороги, снижается температура тела, спустя 15 мин наступает смерть от асфиксии. На вскрытии отмечают эмфизему легких, несвертываемость крови, кровоизлияния в слизистую оболочку желудка, кишечника и других органах. Если же животному, выжившему после шока, снова ввести сыворотку, то никакой реакции не бывает в результате состояния десенсibilизации. У человека и животных анафилаксия часто возникает вследствие повторных введений гетерогенных иммунных сывороток, используемых для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, а также при введении некоторых антибиотиков.

У человека при анафилактоическом шоке отмечают одышку, отек тканей, частый пульс, падение артериального давления, судороги, боли в суставах, снижение температуры тела, появление сыпи на теле, часто потеря сознания и смерть. У крупного рогатого скота анафилактоический шок наблюдали после повторного введения противосибиреязвенной лошадиной сыво-

ротки, у свиней — на повторное введение гетерогенной противорожистой сыворотки.

Механизм развития анафилаксии. На первично введенный антиген (белок) в организме вырабатываются антитела классов IgE и IgG. Они обладают выраженными цитотрофными свойствами, т. е. сродством с клетками собственного вида (гомцитотропность) или сродством с клетками другого вида (гетероцитотропность) животных. Антитела в основном фиксируются на базофилах и тучных клетках. При повторном введении антигена происходит специфическое взаимодействие сложного комплекса: антиген соединяется с фиксированными на клетках антителами и рецепторами клеточных поверхностей. В результате эти клетки выделяют медиаторы: гистамин, серотин, анафилотоксин, брадикинин, гепарин, кинины и др., которые обуславливают клиническую картину анафилаксии. Следовательно, эта форма аллергической реакции связана с В-лимфоцитами, однако синтез антител (IgE, IgG) осуществляется в основном на тимузависимый антиген при участии Т-хелперов.

Пассивная анафилаксия. Анафилаксию можно искусственно воспроизвести у здоровых животных пассивным путем, т. е. введением иммунной сыворотки сенсibilизированного животного. В результате у животного через несколько часов (4–24) развивается состояние сенсibilизации. При введении такому животному специфического антигена проявляется пассивная анафилаксия.

Десенсibilизация. С целью предупреждения появления анафилаксии проводят десенсibilизацию, предложенную А. М. Безредка. Сущность ее заключается в том, что сенсibilизированному животному за 1–2 ч до введения основной дозы сыворотки (антигена) вводят подкожно небольшое количество сыворотки (антигена) в зависимости от вида животных. Анафилаксию можно предупредить неспецифическими средствами, дачей препаратов, обладающих десенсibilизирующими свойствами, — димедрола, супрастина, атропина и др.

Атопии (от греч. atopos — странный, необычный). К ГНТ относят атопии, которые представляют собой естественную сверхчувствительность, спонтанно возникающую у предрасположенных к аллергии людей и животных. Атопические заболевания наиболее изучены у людей — это бронхиальная астма,

аллергический ринит и конъюнктивит, крапивница, пищевая аллергия к землянике, меду, яичному белку, цитрусовым и др. Атопии обуславливаются выработкой на аллерген специфических антител класса IgE (ранее называемых реагинами), обладающих кожносенсibiliзирующей активностью и способностью фиксироваться на клетках различных органов и тканей. Антитела IgE в основном взаимодействуют с антигенами на поверхности базофилов и тучных клеток, образуя иммунные комплексы, разрушающие эти клетки с выделением медиаторов аллергии.

В зависимости от того, где локализуется комплекс «антиген — антитело», происходит развитие определенной формы аллергической реакции. Например, при встрече антигена с антителом на коже появляется крапивница, в верхних дыхательных путях — аллергический насморк, в слизистой оболочке глаза — конъюнктивит, в слизистой оболочке бронхов — бронхиальная астма.

Пищевая аллергия описана у собак и кошек на рыбу, молоко и другие продукты, у крупного рогатого скота отмечена атопическая реакция типа сенной лихорадки при переводе на другие пастбища. В последние годы очень часто регистрируют атопические реакции, вызванные лекарственными препаратами — антибиотиками, сульфаниламидами и др.

Сывороточная болезнь развивается через 8–10 сут. после однократного введения чужеродной сыворотки. Болезнь у людей характеризуется появлением сыпи, напоминающей крапивницу, и сопровождается сильным зудом, повышением температуры тела, нарушением сердечно-сосудистой деятельности, опуханием лимфатических узлов и протекает без смертельных исходов. В основе механизма сывороточной болезни лежит взаимодействие антигена и циркулирующих антител классов IgG и IgM, участвующих в образовании иммунных комплексов, которые активируют комплемент. Поэтому в патогенезе болезни определенную роль играет анафилотоксин; десенсибилизация не предупреждает проявление сывороточной болезни. В практике для предупреждения сывороточной болезни сыворотку перед введением прогревают в течение 1 ч при 56°C, однако указанный способ не всегда эффективен. Для лечения используют антигистаминные препараты.

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Данный тип реакции был обнаружен в 1890 г. Р. Кохом у больного туберкулезом при подкожном введении туберкулина. В дальнейшем

было установлено, что существует ряд антигенов, которые стимулируют преимущественно Т-лимфоциты и обуславливают главным образом формирование клеточного иммунитета. В организме, сенсibilизированном такими антигенами, на основе клеточного иммунитета формируется специфическая гиперчувствительность, которая проявляется в том, что через 12–48 ч на месте повторного введения антигена развивается воспалительная реакция. Ее типичным примером является туберкулиновая проба. Внутрикожное введение туберкулина больному туберкулезом животному вызывает на месте инъекции отечную болезненную припухлость, повышение местной температуры. Реакция достигает максимума через 48 ч.

Повышенную чувствительность к аллергенам (антигенам) патогенных микробов и продуктам их жизнедеятельности называют *инфекционной аллергией*. Она играет важную роль в патогенезе и развитии таких инфекционных болезней, как туберкулез, бруцеллез, сепсис, аспергиллез и др. При выздоровлении животного гипергическое состояние еще долго сохраняется. Специфичность инфекционных аллергических реакций позволяет использовать их с диагностической целью. Промышленным способом на биофабриках готовят различные аллергены — туберкулин, маллеин, бруцеллогидролизат, тулярин и др.

Механизм развития ГЗТ. В реакциях этого типа главную роль играют Т-лимфоциты (ТГЗТ-клетки), имеющие специфическую чувствительность к определенному аллергену. Введение аллергена в ткани сенсibilизированного (больного) организма сопровождается накоплением Т-лимфоцитов в месте поступления аллергена. Сенсibilизированные Т-лимфоциты связываются своими рецепторами с аллергеном (антигеном) и разрушают его с помощью выделяемых ферментов и лимфокинов. Лимфокины привлекают в очаг клетки другой специфичности (макрофаги, гранулоциты) и включают их в реакции клеточного иммунитета. В результате контакта клеток с аллергеном из них высвобождаются различные биологически активные вещества — гистамин, серотонин, брадикинин и др. Поступая в ткани, эти вещества вызывают их повреждение.

Следует отметить, что в некоторых случаях аллергическая реакция отсутствует у больного (сенсibilизированного) животного, это явление получило название *анергии* (ареактивности),

которая может быть положительной и отрицательной. Положительная анергия отмечается, когда иммунобиологические процессы в организме активированы и контакт организма с аллергеном быстро приводит к его элиминации без развития воспалительной реакции. Отрицательная анергия обуславливается ареактивностью клеток организма и возникает, когда защитные механизмы подавлены, что свидетельствует о беззащитности организма.

Отсутствие или недостаточная выраженность реакций ГЗТ могут быть обусловлены значительным снижением числа и нарушением функции Т-лимфоцитов, в частности высокой активностью Т-супрессоров.

При диагностике инфекционных болезней, сопровождающихся аллергией, иногда отмечают явления парааллергии и псевдоаллергии. *Парааллергия* — явление, когда сенсibilизированный (больной) организм дает реакцию на аллергены, приготовленные из микробов, имеющих общие или родственные аллергены, например микобактерии туберкулеза и атипичные микобактерии. Для диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота используют птичий туберкулин.

Псевдоаллергия (гетероаллергия) — наличие неспецифической аллергической реакции в результате аутоаллергизации организма продуктами распада тканей при развитии патологического процесса. Например, на туберкулин у крупного рогатого скота, больного лейкозом, эхинококкозом или другими болезнями.

Различают следующие аллергические реакции замедленного типа: инфекционную аллергию; контактную аллергию; аллергические реакции к растворимым белкам; аутоаллергические реакции; аллергические реакции при трансплантации. Состояние ГЗТ можно перенести пассивно от сенсibilизированного (больного) здоровому организму с помощью сенсibilизированных Т-лимфоцитов, следовательно, ГЗТ не связана с циркулирующими антителами.

Разделение аллергии на ГНТ и ГЗТ не отражает всей сущности происходящих патологических иммунных реакций, опосредованных антителами. Английские иммунологи Джелл и Кумбс предложили новую классификацию аллергических реакций, подразделяющую их соответственно иммунологическим механизмам на четыре типа.

Реакции I типа (немедленные анафилактические и атопические). Основной их механизм заключается в соединении антигена (аллергена) с фиксированными на поверхности тканевых базофилов тучных клеток IgE и IgG с последующим освобождением медиаторов, обуславливающих картину реакции. К ним относят анафилактический шок, крапивницу, бронхиальную астму, отек Квинке, атопический дерматит.

Реакции II типа (цитолитические, цитотоксические). Механизм данного типа реакций заключается в соединении антител типа IgE или IgM с антигеном (гаптеном), фиксированным на клетках. При активизации комплемента происходит повреждение клеток (резуснесовместимость, гемолитические анемии, лейкопении и др.). По существу, этот же иммунологический механизм направлен на уничтожение микробов с помощью лизиса.

Реакции III типа характеризуются повреждением тканей иммунными комплексами, которые разрушают эндотелий мелких сосудов, вызывая местные и общие тромбозы, нарушая трофику тканей (реакция Артюса, сывороточная болезнь, аллергический альвеолит и др.).

Реакции IV типа (замедленного типа) опосредованы клетками, в основном Т-лимфоцитами (инфекционная аллергия, реакция отторжения трансплантата, аутоаллергические реакции и др.).

Таким образом, аллергия трех типов (I, II, III) обуславливается антителами, аллергия IV типа — Т-лимфоцитами.

В развитии аллергических реакций выделены три стадии:

- иммунологическая — соединение аллергена с антителами или сенсибилизированными лимфоцитами, эта стадия специфична;
- патохимическая — результат взаимодействия аллергена с антителами и сенсибилизированными клетками: из клеток выделяются медиаторы, медленно реагирующая субстанция, а также лимфокины и монокины;
- патофизиологическая — результат действия различных биологически активных веществ на ткани, характеризуется расстройством кровообращения, спазмом гладких мышц бронхов кишечника, изменением проницаемости капилляров, отечностью, зудом и др.

Таким образом, при аллергических реакциях мы наблюдаем клинические проявления, характерные не для прямого действия антигена (микробов, чужеродных белков), а довольно однотипные, свойственные аллергическим реакциям симптомы.

Инфекционная аллергия. Установлено, что при многих инфекционных болезнях развивается повышенная реактивность организма в отношении возбудителя инфекции, а также продуктов его жизнедеятельности. Такое состояние инфицированного организма называют *инфекционной аллергией*, а антигены, вызывающие ее, — *аллергенами*.

Первый аллерген — туберкулин — был получен Р. Кохом в 1890 г. в период его изысканий специфического лечебного средства против туберкулеза. Аллергическая реактивность отмечается при туберкулезе, сапе, бруцеллезе, туляремии, трихофитии, эпизоотическом лимфангоите лошадей.

Аллергическая реакция отличается довольно высокой специфичностью, что и используется в целях диагностики. При сапе, туберкулезе, бруцеллезе она приобрела значение метода прижизненной диагностики этих инфекций. При них повышенная чувствительность к аллергену у животных наступает вскоре после заражения (от нескольких суток до нескольких недель) и может сохраняться годами, а также после клинического выздоровления.

Однако столь продолжительное аллергическое состояние сохраняется не у всех выздоровевших животных (сап, бруцеллез, туберкулез), поэтому может наступить анергия (ареактивность), которая, при стойко компенсированной форме инфекционного процесса, указывает на благоприятный исход болезни. Но в ряде случаев при тяжелом течении заболевания возможно исчезновение аллергического состояния на почве истощения животного, это называют отрицательной анергией.

В результате продолжительных многократных исследований (на протяжении многих месяцев и лет) установлено, что реактивность организма на аллерген колеблется от резкой до слабой соответственно характеру течения инфекционного процесса. Также возможен вариант полного выпадения аллергической реакции.

В прошлом аллергическую реакцию рассматривали во всех случаях как показатель наличия инфекционного процесса. Однако исследования отечественных ученых установили, что она может сохраняться (в частности, при бруцеллезе) весьма про-

должительное время не только после клинического выздоровления, но и после полного освобождения организма от возбудителя болезни («биологическое» выздоровление).

Степень выраженности аллергической реакции инфицированного организма зависит от места и метода введения аллергена. Маллеин и туберкулин можно вводить подкожно, внутрикожно, в конъюнктивальный мешок, интрапальпебрально (в веко). При туберкулезе наибольшей чувствительностью отличается внутрикожная проба. При сапе метод глазной пробы (офтальмо-реакция) и метод подкожной маленизации почти равноценны. Однако первый более удобен для исполнения. При бруцеллезе аллерген (бруцеллизат) принято вводить внутрикожно.

Аллергическая реакция появляется обычно спустя несколько часов в виде воспалительного местного процесса (гнойный конъюнктивит, воспалительный отек). После подкожной инфильтрации (маллеин, туберкулин) помимо местного отека инфильтрата возможна также общая реакция организма: подъем температуры до 40°C и выше, состояние депрессии и некоторые другие симптомы.

У здоровых животных даже многократными инъекциями туберкулина (маллеина, бруцеллизата) невозможно вызвать сенсибилизацию к данным аллергенам. Аллергическая реакция проявляется лишь у животных, больных или перенесших инфекцию в прошлом.

Аллергические реакции отличаются высокой специфичностью, но бывают и исключения. В редких случаях возможна также парааллергия, вызываемая группоспецифическими компонентами аллергенов, изготовленных из неродственных микроорганизмов. Так, например, лошади-маллеинщики реагируют в определенном проценте случаев на туберкулин (офтальмо-проба), уайтоморин (препарат, приготовленный из возбудителя псевдосапа), пиоцианин (препарат из *P. aeruginosa*), а больные туберкулезом коровы иногда — на маллеин (офтальмопроба). При паратуберкулезе парааллергия настолько выражена, что при исследовании крупного рогатого скота вместо паратуберкулина рекомендуется применение птичьего туберкулина.

У больных туберкулезом или сапом животных можно искусственно повысить сенсибилизацию к аллергену. Последнее обстоятельство широко используют при аллергической диагностике

туберкулеза и сапа (глазная проба). Повторное введение соответствующих аллергенов в конъюнктивальный мешок обычно вызывает через 5–6 сут. более резко выраженную офтальморекцию. В некоторых случаях отмечается ярко выраженная реакция на глазную пробу при отрицательном результате первого испытания аллергенов. При отрицательном или сомнительном результате внутрикожной пробы повторно вводят аллерген (туберкулин, бруцеллизат) через 24–48 ч.

Одно время полагали, что при инфекционной аллергии, в отличие от анафилактического состояния, нельзя искусственно вызвать десенсибилизацию. Однако практика подкожной туберкулинизации доказала иное. Оказалось, что в результате подкожной туберкулинизации у туберкулезных коров создается состояние десенсибилизации к повторному подкожному введению туберкулина сроком примерно на 2 мес.

Аллергическое состояние, в отличие от анафилаксии, видимо, не связано с образованием антител, вследствие чего пассивная передача аллергии сывороткой реагирующего на аллерген организма подопытному здоровому животному не удается: так, сывороткой коровы, реагирующей на туберкулин, или лошади, реагирующей на маллеин, нельзя вызвать аллергическую реакцию у здоровой коровы или лошади.

Применяемые в нашей стране аллергены — фильтраты убитых культур, лишённые микробных тел (туберкулин, маллеин, бруцеллизат), — у здоровых животных не стимулируют образование антител. Однако бывают аллергены и иного порядка — корпускулярные, содержащие убитые микробные тела (например, абортин). Им присуще антигенное действие, а также способность сенсibilизировать организм здоровых животных.

Аллергические явления представляют собой рефлекторные реакции инфицированного организма на специфический раздражитель. Охранительное торможение (лекарственный сон) резко угнетает все виды аллергических реакций. Больные туберкулезом куры в состоянии наркоза (вызванного уретаном) не реагируют на туберкулин (С. Н. Ованесова). Угасание аллергической реакции (иммунизаторное торможение) на аллерген (туберкулезный, бруцеллезный, туляремийный) в результате его частых, многократных внутрикожных инъекций было установлено в опытах на инфицированных животных. Десенси-

билизацию можно вызывать у больных туберкулезом кур однократным введением большой дозы туберкулина. Таким образом, анаergia является следствием перераздражения центральной нервной системы аллергенами.

ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Иммунодефицитные состояния, или недостаточность иммунитета, могут быть результатом генетических дефектов развития определенных звеньев системы иммунитета или следствием различных воздействий на организм: неполноценное кормление, влияние иммунодепрессантов (подавляющие иммунную систему), ионизирующего излучения и т. д. Нарушения защитных систем организма на генетической основе (врожденные, генетически детерминированные) классифицируют как *первичные иммунодефициты*; приобретенные нарушения — как *вторичные иммунодефициты*. Иммунодефицитные состояния обуславливаются качественными изменениями защитных факторов или их компонентов.

Первичные иммунодефицитные состояния могут зависеть от дефицита Т- и В-системы иммунитета и вспомогательных клеток, а также бывают комбинированные. При недостаточности гуморального иммунитета преобладают бактериальные инфекции, а при недостаточности клеточного — вирусные и грибковые.

Недостаточность гуморального иммунитета связана с нарушением со стороны В-клеток и проявляется в склонности к гнойно-воспалительным заболеваниям. Некоторые организмы не способны вообще продуцировать гамма-глобулины и вырабатывают преимущественно неполные антитела.

Различают три типа недостаточности антител: физиологическую, наследственную (первичную) и приобретенную.

Физиологическая недостаточность наблюдается у молодняка до трех месяцев. В здоровом организме при рождении в крови содержится материнский IgG и небольшое количество собственных IgG, IgM и IgA. Иммуноглобулины, полученные от матери, содержат антитела против всех видов микробов, с которыми контактировала мать, благодаря чему молодняк защищен против них на протяжении первых месяцев жизни. Затем уровень материнских иммуноглобулинов постепенно снижается, уровень же иммуноглобулинов молодняка в крови повышается. Однако поскольку уровень IgA в первые месяцы

низкий, то организм оказывается высоковосприимчивым к респираторным и кишечным инфекциям.

Наследственная недостаточность — гипо- или агаммаглобулинемия — встречается чаще. Молодняк с агаммаглобулинемией обычно погибает от инфекции в раннем возрасте.

Приобретенная недостаточность антител является результатом патологических изменений в постнатальном периоде и встречается чаще, чем наследственная. Все виды приобретенной недостаточности антител разделяют на пять категорий: физиологическая; катаболическая; костно-мозговые нарушения; недостаточность, зависящая от токсических факторов, и первичная ретикулоэндотелиальная неоплазия. При нарушениях первых трех категорий снижается преимущественно уровень IgG, а при нарушениях последних двух происходит снижение уровня IgA, затем и IgG.

При недостаточности клеточного иммунитета отсутствуют или снижены иммунные реакции замедленного типа, наблюдаются повторные заболевания вирусными инфекциями и др. Как правило, синдром недостаточности клеточного иммунитета сочетается с поражением тимуса, щитовидной железы. Молодняк с дефицитом Т-системы иммунитета тяжело переносит вирусные инфекции. Инфекции с Т-дефицитным состоянием организма развиваются вскоре после рождения. При одновременной недостаточности клеточного и гуморального иммунитета гибель наступает от вирусной, бактериальной или грибковой инфекции в первые недели жизни.

Иммунодефицитные состояния необходимо учитывать при селекции, разработке лечебно-профилактических мероприятий в хозяйстве. Дефекты иммунной системы выявляют, используя объективные и чувствительные методы оценки состояния иммунной системы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Что такое иммунология? Вклад Пастера в иммунологию.
2. Дайте определение иммунитета.
3. Из каких факторов состоит неспецифический (естественный) противомикробный иммунитет?
4. Перечислите анатомофизиологические факторы иммунитета.
5. Назовите гуморальные факторы неспецифической защиты.

6. В чем заключается суть факторов клеточного иммунитета?
7. Что понимают под термином «бактерицидная активность сыворотки крови» (БАС), за счет каких компонентов она проявляется?
8. Что такое фагоцитоз? Назовите фагоцитирующие клетки.
9. В чем отличие завершеного фагоцитоза от незавершеного?
10. Назовите формы специфических реакций на введенный антиген.
11. Дайте определение понятия «антиген».
12. Каковы основные свойства антигенов?
13. Какими свойствами обладают полноценные и неполноценные антигены?
14. Какие антигены имеются у микроорганизмов?
15. Что такое протективные антигены?
16. Что такое гуморальный иммунитет?
17. Дайте определение термину «антитело-иммуноглобулин».
18. Что такое полные, неполные и нормальные антитела?
19. Значение активного центра антител?
20. Охарактеризуйте свойства пяти классов иммуноглобулинов.
21. Что означают термины «аффинитет» и «авидность антител»?
22. Что является общим для всех серологических реакций?
23. В чем заключается сущность реакции агглютинации?
24. Что происходит при положительной РП? Какие варианты постановки РП вы знаете?
25. Какие системы принимают участие при постановке РСК?
26. В чем заключается суть реакции флюоресцирующих антител?
27. В чем заключается суть иммуноферментного метода?
28. В чем заключается сущность радиоиммунологического анализа?
29. Что такое иммунологическая толерантность?
30. Каким образом можно индуцировать иммунологическую толерантность?
31. Что такое аллергия?
32. Назовите механизмы развития ГНЗ и ГЗТ.
33. Что такое анафилаксия?
34. Что понимают под термином «инфекционная аллергия»?
35. Каковы стадии развития аллергических реакций?
36. Какие аутоиммунные заболевания вы знаете?
37. Приведите болезни, обусловленные иммунными комплексами.
38. Какими факторами обуславливается недостаточность иммунной системы?
39. В чем особенности иммунной защиты при бактериальных и вирусных болезнях?

В борьбе с инфекционными заболеваниями особое место отводят своевременной диагностике, специфической профилактике и терапии. Для этих целей биологическая промышленность выпускает различные биологические препараты, которые подразделяются на следующие группы:

- 1) вакцины;
- 2) лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины;
- 3) диагностические антигены, сыворотки и аллергены;
- 4) бактериофаги.

5.1. ВАКЦИНЫ

Вакцины — средства специфической активной иммунопрофилактики. Выпускают живые, инактивированные, химические вакцины, анатоксины, генноинженерные и др.

Живые вакцины готовят из штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью (аттенуированные). Главное требование, предъявляемое к вакцинным штаммам, — наличие стойкой наследственно передающейся остаточной вирулентности. При введении таких штаммов микроорганизмов в организм культура должна приживаться и размножаться, но не вызывать клинических проявлений болезни, что приводит к созданию иммунитета высокой напряженности и длительности.

Вакцинные штаммы получают различными способами.

1. Использование аттенуированных (с ослабленной вирулентностью) штаммов, возникших в естественных условиях обитания возбудителей инфекционных болезней.

2. Искусственное получение аттенуированных штаммов возбудителей в лабораторных условиях:

- выращивание возбудителя на искусственных питательных средах;
- перевод возбудителя на другой вид восприимчивого животного;
- перевод возбудителя на невосприимчивый вид животного.

3. Ослабление вакцинных штаммов прямым (непосредственным) воздействием на ген возбудителя мутагенами физической природы: проникающая радиация, ультрафиолетовое излучение, пониженная или повышенная температура и др.

4. Комбинированные методы получения вакцинных штаммов в лабораторных условиях.

5. Изменение генома вакцинных штаммов с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

Для приготовления вакцин аттенуированные штаммы возбудителей культивируют на специальных питательных средах в реакторах, куриных эмбрионах или культурах клеток и тканей. Полученную биомассу очищают от балластов и после проверки на безвредность, микробную загрязненность и активность в соответствии с общепринятыми методами используют для иммунизации животных и птиц.

Живые вакцины имеют ряд преимуществ перед вакцинами других типов. Главное из них — высокая иммуногенность, т. е. создание иммунитета высокой напряженности и длительности, приближающегося к постинфекционному; однократная иммунизация; возможность введения естественными путями и др. Среди недостатков живых вакцин следует отметить следующие: необходимость соблюдения мер предосторожности при их транспортировке; хранение при температуре 4–10°C; поствакцинальные реакции и осложнения; реверсия вирулентности; после вакцинации бактериальными вакцинами нельзя применять антибактериальные препараты в течение 7 сут.

В настоящее время биопромышленность выпускает живые вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза, бруцеллеза, туляремии, листериоза, рожи свиней, сибирской язвы и др.

Живые вакцины проверяют на однородность, безвредность и активность.

Для приготовления *инактивированных вакцин* в качестве штамма используют высоковирулентные и иммуногенные штаммы микроорганизмов, выращенные в жидких питательных средах в котлах-реакторах; выход бактериальной массы с плотных питательных сред незначительный. По истечении срока культивирования бактериальную массу собирают и инактивируют. Последовательность этих операций определяется методом выращивания культур микробов. Так, при использовании жидких питательных сред культуру возбудителя вначале инактивируют в том же реакторе, где проводилось выращивание, а затем микробную массу отделяют от жидкой фракции центрифугированием. Если применяют плотные питательные среды, то выросшую на них культуру смывают физиологическим раствором в стерильные бутылки, в которых ее инактивируют.

Для инактивации микроорганизмов сочетают различные физические факторы (нагревание) и химические вещества (формалин, фенол и др.), в основном формалин, который необходимо добавлять в небольшом количестве (от 0,2 до 0,5% и выдерживать при температуре 37°C в течение нескольких недель), так как в более высокой дозе он отрицательно действует на антигенную структуру микроорганизмов.

Стандартизацию инактивированной взвеси культуры микроорганизмов проводят путем сравнения с эталонами различной мутности, фотометрически подогнанными к мутности взвеси бактерий определенной концентрации. Приготовленную взвесь культуры проверяют на стерильность, безвредность и активность.

Для повышения эффективности инактивированных вакцин применяют депонирующие средства, на которых микробные тела адсорбируются (алюминиевые квасцы, гидроксид алюминия) или их эмульгируют в минеральных маслах. Добавление депонирующих веществ к инактивированным культурам необходимо для создания «депо» на месте введения препарата, что способствует длительному воздействию микробного антигена на организм животного и обуславливает более высокий уровень образования антител.

Все инактивированные препараты должны быть стерильными. Для контроля на стерильность используют различные пита-

тельные среды, которые обеспечивают надежное выявление аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов и дрожжей. При выявлении бактерий приготовленные препараты уничтожают.

Важнейшим элементом контроля на безвредность является проверка вакцины на лабораторных животных, а также тех, для которых она предназначена. Обычно для этого используют от трех до пяти животных на каждую серию изготовленной партии; одновременно с этим проводят проверку на лабораторных животных.

Вакцина является безвредной, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов и ухудшения их общего состояния. Одним из наиболее важных свойств вакцины является ее иммуногенность. Иммуногенность препаратов определяют следующим образом: животных, обладающих чувствительностью к микробам, из которых приготовлены вакцины, иммунизируют этими препаратами. Через определенные промежутки времени (14–21 сут.) иммунизированным и контрольным животным вводят установленную дозу культуры микроба (LD 50, или смертельная доза), затем наблюдают за ними в течение определенного периода времени (сроки зависят от особенностей возбудителя). При заболевании (или гибели) контрольных животных иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми.

Химические вакцины применяют для профилактики инфекционных болезней. Они представляют собой антигены и антигенные комплексы, извлеченные из микробных культур и в той или иной степени очищенные от балластных иммунизирующих веществ. В отдельных случаях извлеченные антигены являются в основном бактериальными эндотоксинами, полученными в результате обработки культур различными способами. Другие представляют собой «протективные антигены», продуцируемые некоторыми микробами в процессе жизнедеятельности в организме животных или в специальных питательных средах при соответствующих режимах культивирования (например, протективный антиген сибиреязвенных бацилл).

Анатоксин (от греч. *ana* — обратно и *toxikón* — яд) — токсин, утративший свою токсичность под действием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства.

Специфическая активная профилактика болезней, вызываемых токсинообразующими микроорганизмами, основана на применении биопрепаратов типа анатоксинов, изготавливаемых путем специфической обработки биомассы и обезвреживания экзотоксинов. Анатоксины — аналоги инактивированных вакцин — препараты обезвреженного токсина, очищенного от балластных веществ, сконцентрированного и адсорбированного (чаще на алюмокалиевых квасцах). Введение в анатоксин адсорбента имеет цель повысить его иммуногенные свойства. Основной метод перевода экзотоксина в состояние анатоксина был удачно разработан французским иммунологом Г. Рамоном в 1923 г., который установил, что прибавление к токсину формалина в небольших количествах и выдерживание при 37°C в течение месяца лишает его токсичности с сохранением иммунизирующей активности. Примером служит столбнячный анатоксин.

Общий принцип создания *генноинженерных вакцин* состоит в том, что ген или гены, кодирующие протективные антигены возбудителя, против которого необходимо создать вакцину, «встраиваются» в геном вирусов, бактерий или клеток эукариотов таким образом, чтобы не нарушалась их биологическая активность. При этом наряду с антигенами хозяина нарабатывается и необходимый для получения вакцины протективный антиген.

В практике широко применяют убитые вакцины. В частности, концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец; концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против брадзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят; анатоксинвакцину против инфекционной энтеротоксемии овец; концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против рожи свиней; преципитированную формолвакцину против геморрагической септицемии крупного рогатого скота, овец и свиней; полужидкую формолвакцину против пастереллеза крупного рогатого скота и буйволов; поливалентную вакцину против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных; формолквасцовую вакцину против паратифа поросят; концентрированную формолквасцовую вакцину против

паратифа телят; концентрированную поливалентную формол-квасцовую вакцину против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии телят; концентрированный квасцовый столбнячный анатоксин, поливалентную вакцину против колибактериоза и паратифа телят, поросят, пушных зверей и птиц.

Поливалентные вакцины готовят из нескольких типов одного вида микроорганизмов. *Ассоциированные* вакцины содержат антигены разных видов возбудителей.

5.2. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Изготовление лечебно-профилактических иммунных сывороток и иммуноглобулинов производит биологическая промышленность. В качестве продуцентов иммуносывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию осуществляют нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента на антиген.

По окончании цикла иммунизации, когда в сыворотке крови продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных берут кровь. Чаще это делают на 10–14-е сут. после введения продуценту последней дозы антигена.

Из крови отделяют сыворотку общепринятыми методами и стерилизуют ее через бактериальные фильтры или методом тиндализации. В качестве консервантов используют 0,25–0,5% -ные растворы фенола, 0,01–0,03% -ные растворы тиомерсала (мертиолята) или другие. Контроль на стерильность сыворотки проводят по общепринятой методике посевами из препарата на питательные среды (МПА, МПБ с глюкозой, МППБ и на агар Сабуро).

Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Они должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Специфическую активность сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы инфекционного агента или токсина, тем выше ее активность.

На каждую проверенную серию сыворотки заполняют паспорт, в котором указывают основные показатели: биофабрику, изготовившую сыворотку, название препарата, номер серии, дату изготовления, метод консервирования, титры, сроки и способы хранения. На этикетке указывают лечебные и профилактические дозы в зависимости от вида и возраста животных. Вводят сыворотку обычно внутримышечно или внутривенно.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, так как они создают лишь временный пассивный иммунитет, который наступает в ближайшие 2–3 ч и не превышает 2–3 нед.

В ветеринарии применяют следующие сыворотки: поливалентная антитоксическая сыворотка против паратифа телят, ягнят, овец и птиц; поливалентная антитоксическая сыворотка против колибактериоза телят, поросят, ягнят; гипериммунная сыворотка против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней; сыворотка против рожи свиней; антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец; сыворотка против диплококковой септицемии телят, ягнят, поросят; антитоксическая противостолбнячная сыворотка.

Сыворотка реконвалесцентов — это сыворотка крови переболевших животных, содержащая специфические антитела, применяется с лечебной и профилактической целями.

Сыворотку реконвалесцентов рекомендуется получать и применять животным в одном и том же хозяйстве. Кровь от животных-доноров берут непосредственно в хозяйстве или во время убоя их на мясокомбинате.

Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (возбудителем). В большинстве случаев продуцентами сывороток являются лабораторные животные (кролики, морские свинки), петухи, реже лошади. Готовые сы-

воротки проверяют на стерильность, активность и специфичность. Все они содержат специфические антитела к определенному антигену.

Диагностические сыворотки применяют в серологических реакциях в следующих целях:

- для индикации возбудителя болезни в патологическом материале (сибирская язва и др.);
- при определении вида (серогруппы, серовара) возбудителей инфекции, выделенных в чистой культуре (сальмонеллез, бруцеллез, листериоз и др.);
- в качестве заведомо положительного контроля при постановке любой серологической реакции.

Из диагностических сывороток готовят иммуноглобулины общепринятыми методами.

Иммуноглобулины. Важнейшей составной частью сыворотки крови являются белки, основная масса которых представлена альбуминами и глобулинами.

Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки, в которой методом электрофореза обнаружены α -, β - и γ -глобулины. При гипериммунизации животных в сыворотке крови увеличиваются γ - и β -глобулиновые фракции. В настоящее время белки, синтезирующиеся в организме в ответ на антигенное раздражение и обладающие свойством антител, обозначают термином «иммуноглобулины».

Таким образом, антитела, синтезирующиеся в организме, неоднородны. С целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования.

Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них активных белковых фракций — иммуноглобулинов — и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител.

Препараты иммуноглобулинов, содержащие γ - и β -глобулиновые фракции сыворотки крови, намного превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из нативной сыворотки.

В настоящее время выпускают специфические иммуноглобулины против бешенства, столбняка, сибирской язвы и др.

Иммуноглобулины вводят подкожно или внутримышечно в дозах 0,5–2,0 мл/кг массы тела.

Антитоксические сыворотки — сыворотки, в состав которых входят антитела (иммуноглобулины), способные специфически связывать и нейтрализовать токсины микробного, растительного и животного происхождения. В целом же данным термином называют гипериммунные сыворотки, содержащие эти антитела.

Антитоксические сыворотки применяют для профилактики и лечения столбняка, ботулизма, злокачественного отека. Сыворотки вводят на ранних сроках заболевания. Антитоксинотерапия неэффективна, если клинические признаки болезни уже четко выражены, так как антитоксины не оказывают лечебного действия и могут лишь предотвратить развитие интоксикации. Как и у всех иммуноглобулинов, их действие не превышает 2–3 нед.

5.3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АНТИГЕНЫ И АЛЛЕРГЕНЫ

Принцип и методика приготовления антигена аналогичны приготовлению инаktivированных вакцин.

Антигены, как и другие диагностические препараты, готовят на биофабриках (биокомбинатах). В своем составе они содержат убитые целые микробные клетки или экстракты, полученные из соответствующих микроорганизмов.

В ветеринарии для диагностики инфекционных болезней используют следующие антигены:

1) единый бруцеллезный антиген для РА, РСК (РДСК) — биомасса из вакцинного штамма 19, выращенная на обогащенном печеночном агаре, которую инаktivируют нагреванием и устанавливают концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту до 10 млрд/мл;

2) бруцеллезный антиген для кольцевой реакции с молоком (КР) — взвесь убитых нагреванием бруцелл, окрашенных в синий цвет гематоксилином;

3) бруцеллезный антиген для РА на стекле (роз-бенгал) — суспензия убитых нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым;

4) стандартный сибиреязвенный антиген для РП — экстракт из убитых нагреванием бацилл вирулентного штамма сибирской язвы;

5) сальмонеллезные антигены;

6) цветной антиген для диагностики пуллороза, тифа птиц и сальмонеллеза водоплавающих птиц;

7) антиген листериозный;

8) сапной антиген;

9) антиген вибриозный (кампилобактериозный);

10) антиген для диагностики микоплазмоза птиц в сыворочно-капельной реакции агглютинации;

11) антигены для диагностики лептоспироза в реакции макроагглютинации.

Аллергены в качестве диагностических препаратов представляют собой экстракты из бактериальной массы, их выпускают биофабрики (биокомбинаты).

Указанные препараты используют при аллергической диагностике туберкулеза (туберкулин), паратуберкулеза (паратуберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сапа (маллеин), туляремии (тулярин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне (в течение 6–8 нед.). Затем культуру стерилизуют в автоклаве, упаривают до 1/10 объема, отстаивают, фильтруют через бактериальные фильтры (Зейтца) и добавляют 50% глицерина. Контроль качества аллергена включает в себя установление стерильности и специфической активности, которую проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

5.4. БАКТЕРИОФАГИ–ВИРУСЫ

Бактериофаги-вирусы обладают способностью проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их лизис. Источником фагов патогенных микробов служат больные и переболевшие животные и люди, выделяющие с фекалиями фаги во внешнюю среду.

Фаг получают путем добавления в котлы с бульонными бактериальными культурами производственного фага. После

выдерживания при 37°C в течение суток культуры фильтруют. Фильтрат проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность.

Учитывая высокую специфичность действия бактериофагов на гомологичные им организмы, для дифференцирования и индикации некоторых видов бактерий с успехом применяют соответствующие фаги (например, при сибирской язве, паратифозных инфекциях и др.). Разработана фагодиагностика многих инфекционных болезней (бруцеллез, пастереллез, сальмонеллез, колибактериоз и др.), а также фаготерапия и фагопрофилактика.

Фагодиагностику можно использовать при санитарно-бактериологических исследованиях объектов окружающей среды для обнаружения бактериофага в воде, почве в качестве показателя их загрязнения соответствующим фагу микробом.

Биологическая промышленность выпускает следующие диагностические бактериофаги: сибиреязвенный, листериозный, бруцеллезный, стафилококковые бактериофаги для типирования штаммов.

5.5. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лиофилизацию микроорганизмов (биологических препаратов) применяют с целью длительного хранения микроорганизмов и биопрепаратов.

Этот метод заключается в обезвоживании биологических объектов при низких температурах под вакуумом, т. е. вода удаляется из замороженного материала путем испарения льда, минуя жидкую фазу. Лиофилизированные биопрепараты сохраняют длительное время свои первоначальные свойства и легко растворяются в воде.

Лиофильная сушка биопрепаратов включает в себя два этапа:

- 1) жидкие биопрепараты, разлитые по ампулам или флаконам, замораживают при температуре от -40 до -60°C;
- 2) замороженные препараты переносят в сушильную камеру и создают глубокий вакуум.

Ампулы или флаконы быстро запаивают или закупоривают, предварительно создавая в них вакуум, или заполняют инертным газом. В настоящее время в ветеринарии применяется большое количество сухих вакцин и других биопрепаратов.

5.6. ПРАВИЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ, ИХ ТРАНСПОРТИРОВКА

Эффективность биологических препаратов во многом зависит от соблюдения правил применения, режима и условий их хранения. В работе с биопрепаратами необходимо действовать в соответствии с рекомендациями и наставлениями по их применению. Соблюдение условий хранения биопрепаратов гарантирует стабильность иммуногенных свойств, их высокую активность и специфичность. Повышенные требования предъявляют к хранению и транспортировке живых аттенуированных вакцин, поскольку разгерметизация флаконов, как правило, приводит к инактивации вакцинных штаммов. Сухие биопрепараты имеют ряд существенных преимуществ, так как они сохраняют свои свойства в довольно широком диапазоне температур.

Вакцины, содержащие в своем составе депонирующие вещества, перед применением необходимо интенсивно взбалтывать до получения равномерной взвеси.

Эмульгированные вакцины, содержащие минеральные масла, перед введением необходимо подогреть в водяной бане при температуре 36–37°C, а затем тщательно взболтать. Совершенно недопустимо замораживание жидких вакцин. Использованию подлежат биопрепараты только с не истекшим сроком годности, без наличия хлопьев и различного рода осадков, плесени, помутнения, видимых внешних повреждений флаконов.

При растворении сухих биопрепаратов применяют только указанный в наставлении разбавитель. Живые вакцины, оставшиеся после проведения вакцинации, подлежат уничтожению кипячением.

Все флаконы и ампулы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку. Хранят и транспортируют прививочные средства при условиях, не влияющих на их внешний вид, специфические свойства в течение срока годности.

В производственных условиях биопрепараты хранят в холодильных установках с определенным микроклиматом или

на специальных складах (подвалы). Помещения (склады) для хранения биопрепаратов должны быть сухими, темными и прохладными, с равномерной в течение всего года температурой 2–15°C. Для хранения каждого вида препарата должно быть выделено определенное оборудованное место или отделение (полка, шкаф). Воспрещается совместное хранение годных и выбракованных препаратов. Помещение для хранения препаратов должно быть закрыто, а ключ должен находиться у ответственного лица. Биопрепараты выбраковывают при отсутствии на флаконах этикеток, повреждении упаковки, просачивании препарата через пробку, промерзании, наличии посторонних примесей, плесени, пленок, комочков, гнилостного запаха, изменений установленной консистенции и цвета. Браковку препаратов проводят комиссионно с участием ветеринарного врача. Уничтожение забракованных препаратов проводят путем автоклавирования или кипячения при составлении акта.

Транспортировку больших партий биопрепаратов в зимнее время производят в обогреваемых вагонах или на обогреваемых автомашинах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Приведите классификацию биопрепаратов по целевому назначению.
2. Какие требования предъявляют к живым аттенуированным вакцинам? Их преимущества и недостатки.
3. Какие требования предъявляют к инактивированным вакцинам?
4. Какой иммунитет возникает при введении вакцин?
5. По каким показателям проводят контроль качества вакцин?
6. Как готовят лечебно-профилактические сыворотки?
7. Назовите требования, предъявляемые к диагностическим сывороткам и иммуноглобулинам.
8. Какие диагностические антигены, аллергены и бактериофаги вы знаете?

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ*

*Микробиологические исследования по всем темам лабораторных занятий проводятся согласно ГОСТам РФ.

ТЕМА 1

Задачи бактериологической лаборатории, техника безопасности при работе с микроорганизмами. Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала. Световой микроскоп, особенности микроскопирования при использовании иммерсионной системы. Основные формы бактерий

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

Материальное обеспечение: комплект микроскопов, люминесцентные лампы для освещения, иммерсионное масло, папки с набором готовых окрашенных препаратов, приготовленных из микроорганизмов, имеющих различную морфологию, таблицы: «Ход лучей в сухой и иммерсионной системе», «Основные формы бактерий».

Оборудование микробиологической лаборатории.

1. Микроскопы — оптические, люминесцентные, осветительные приборы.

2. Термостаты, в которых автоматически поддерживается температура, оптимальная для выращивания микроорганизмов в диапазоне от 28 до 43°C.

3. Электрический сушильный шкаф и автоклав, предназначенные для стерилизации лабораторной посуды, питательных сред и спецодежды.

4. Холодильники и морозильные камеры, используемые для хранения питательных сред, музейных бактериальных культур, биопрепаратов, а также исследуемого материала.

5. Центрифуги, предназначенные для осаждения микроорганизмов, эритроцитов, для отделения прозрачного экстракта из исследуемого продукта.

6. Дистиллятор, необходимый для получения дистиллированной воды, на которой готовят физиологический раствор, питательные среды, рабочие растворы красок; автоматические водяные бани, аналитические и торзионные весы, колба Бунзена с вмонтированным фильтром Зейтца, керамические фильтры Шамберляна, Беркефельда и вакуумный насос.

7. Лабораторная посуда: колбы, бактериологические, серологические и уленгутовские пробирки, чашки Петри, автоматические пипетки, стеклянные градуированные и пастеровские пипетки, мерные цилиндры. Мелкие металлические инструменты: бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы.

Техника безопасности в микробиологической лаборатории.

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

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

3. За каждым студентом закрепляется рабочее место и микроскоп.

4. Без разрешения преподавателя нельзя включать электроприборы.

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

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

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

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

Принципы организации и оборудование бактериологических лабораторий.

В бактериологических лабораториях проводят исследование патологического материала с целью диагностики инфекционных болезней на туберкулез, бруцеллез, сибирскую язву, рожу свиней и др.

В каждой лаборатории должны быть предусмотрены:

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

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

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

Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала.

При отборе и обработке патологического материала для пересылки в лабораторию необходимо придерживаться следующих правил:

- учитывать патогенез болезни и тропизм возбудителя;
- использовать стерильные инструменты и посуду;
- доставлять его в максимально сжатые сроки;
- отбирать материал до начала лечения антимикробными препаратами.

В лабораторию могут быть направлены:

- для прижизненной диагностики: кровь, сыворотка крови, кал, моча, молоко, экссудаты, гной, соскобы с кожи и др.;
- для посмертной диагностики: паренхиматозные органы, лимфоузлы, мышцы, сердце целиком с кровью, головной мозг, трубчатая кость, абортрованный плод и др.;
- пробы из объектов внешней среды: воды, почвы, фуража; клещи, насекомые, грызуны и др.

Трупы мелких животных, а также поросят, ягнят, телят лучше посылать целиком во влагонепроницаемой таре.

Трубчатые кости, посылаемые на исследование, должны быть целыми, с неповрежденными концами, обернутыми в марлю или полотно, смоченное дезинфицирующей жидкостью (5% -ным раствором карболовой кислоты).

Кровь берут в пробирки или колбы из яремной вены с соблюдением стерильности. Кал берут из прямой кишки стеклянной трубкой с оплавленными краями, один конец трубочки закрывают ватно-марлевой пробкой. После взятия кала трубку опускают в пробирку с физиологическим раствором. Мочу у животных берут с помощью катетера.

Перед отбором молока сосок вымени дезинфицируют 70% -ным спиртом, сдаивают 100–150 мл молока в банку с дезраствором, а последующие порции в количестве 30 мл — в стерильные сосуды.

Соскобы со слизистых оболочек и кожи берут стерильным скальпелем в стерильную посуду с пробкой. Абортированный плод первой половины беременности направляют целиком. От плодов второй половины беременности берут паренхиматозные органы или плод направляют целиком.

Кусочки селезенки, почек, печени с желчным пузырем берут, используя стерильные инструменты и стерильную посуду.

Желудок и кишечник перевязывают лигатурой с обоих концов и помещают в отдельную посуду. Мозг для исследования направляют целиком.

При упаковке патологического материала необходимо исключить загрязнение его посторонней микрофлорой из внешней среды.

Патологический материал должен быть доставлен в лабораторию в течение первых 24 ч после его взятия. Если эти условия трудно выполнить, то материал необходимо консервировать 30% -ным водным раствором глицерина или 10% -ным водным раствором хлористого натрия или раствором глицерина с хлористым натрием (глицерина — 250 мл; хлористого натрия — 5 г; дистиллированной воды — 750 мл).

Доставка патологического материала в лабораторию осуществляется нарочным. На взятый патологический материал, направляемый в лабораторию, составляется сопроводительное письмо с подробным перечнем направляемого материала, предположительный диагноз, адрес и подпись ответственного лица.

Лабораторная диагностика проводится в три этапа.

1. Микроскопические исследования патологического материала позволяют обнаружить наличие в нем возбудителя, изучить его морфологические особенности и тинкториальные свойства.

2. Бактериологические исследования проводят для выделения чистой культуры возбудителя и изучения его культурально-биохимических свойств, а в ряде случаев — антигенной структуры.

3. Биопробу или заражение лабораторных животных проводят для выделения чистой культуры и определения вирулентности выделенного возбудителя.

Проведенные исследования используют при *идентификации возбудителя* (определение вида) и позволяют поставить бактериологический диагноз.

Световой микроскоп, его устройство и правила работы.

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

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

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

Оптическая часть состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе, между которыми помещена диафрагма. На окуляре имеются цифровые обозначения ($\times 7$, $\times 10$, $\times 15$), показывающие степень увеличения изображения.

Объективы представляют собой систему оптических линз. Только одна линза — фронтальная — выполняет функцию увеличения, остальные — корректирующие. На объективах имеются обозначения, показывающие увеличение, даваемое объективом ($\times 8$, $\times 40$ и $\times 90$):

1) $\times 8$ — объектив применяют для наведения света и поиска объекта;

2) $\times 40$ — объектив применяют для изучения строения микроскопических грибов, дрожжей и подвижности бактерий в препарате «висячая капля»;

3) $\times 90$ — иммерсионный объектив применяют для изучения бактерий с применением иммерсионного масла.

Объективы, дающие увеличение в 8 и 40 раз, называются сухими, так как при работе с ними между объективом и препаратом находится слой воздуха, коэффициент преломления которого равен 1,0, а коэффициент преломления стекла равен 1,52. Данная разница приводит к тому, что часть боковых лучей преломляется и отклоняется, не попадая в объектив, но освещение при этом не ухудшается, так как диаметр линз 8- и 40-кратных объективов достаточно велик.

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

В рассматриваемом микроскопе 90-кратный объектив является иммерсионным, который применяется при изучении бактерий.

Общее увеличение, которое дает микроскоп, равняется произведению степени увеличения объектива на показатель окуляра. В учебном процессе удобнее применять 10-кратный окуляр, дающий оптимальный обзор поля зрения. Следовательно, при изучении под 90-кратным иммерсионным объективом и 10-кратным окуляром микроорганизмы будут увеличены в 900 раз.

Четкость получаемого изображения зависит от разрешающей способности микроскопа, т. е. способности раздельно рассматривать две близко расположенные точки, расстояние между

которыми равно половине длины световой волны. Рассматриваемый нами микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2–0,3 мкм. Из этого следует, что микроорганизмы величиной менее 0,2 мкм в данном микроскопе не видны.

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

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

Выпускаются также дополнительные приспособления, которые позволяют максимально использовать все возможности микроскопа и значительно расширяют диапазон применения: фазово-контрастные приспособления, осветители, окуляр-микрометр и объектив-микрометр для измерения размеров микроорганизмов.

Правила работы со световым микроскопом.

1. Установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа, для этого необходимо:

- поставить объектив $\times 8$ на высоте 1 см от уровня предметного столика;
- поднять конденсор до уровня предметного столика;
- направить плоское зеркало в сторону осветителя.

2. Установить препарат на предметном столике, закрепив клеммами.

3. Нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата.

4. Заменить объектив $\times 8$ на $\times 90$.

5. Под контролем глаза осторожно опустить объектив $\times 90$ в масло.

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

7. Установить четкое изображение с помощью микровинта, вращая его на пол-оборота в ту или иную сторону.

После окончания работы необходимо привести микроскоп в порядок:

- 1) поднять макровинтом тубус микроскопа;
- 2) убрать препарат;
- 3) снять салфеткой масло с $\times 90$ объектива и установить $\times 8$ объектив;
- 4) опустить конденсор;
- 5) положить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

Основные формы бактерий.

Микроорганизмы представляют собой мельчайшие живые организмы, невидимые невооруженным глазом, размеры которых колеблются в широких пределах — от 0,2 до 10 мкм и более (1 мкм составляет 1/1000 долю мм).

Форму и другие особенности бактериальных клеток изучают при помощи микроскопа чаще всего в убитом окрашенном состоянии, реже — в живом в неокрашенном виде.

Форма бактерий — этот первый таксономический признак, который учитывается при идентификации. По форме клеток бактерии подразделяются на шаровидные (кокки), палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии. Кокки имеют форму правильного шара, эллипса, боба и ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают:

- *микрোকки (Micrococcus)* делятся в разных плоскостях и после деления клетки разъединяются, располагаются одиночно или беспорядочно. Относятся к сапрофитам, обитают в почве, воде и воздухе;
- *стафилококки (Staphylococcus)* делятся в трех взаимноперпендикулярных плоскостях, поэтому располагаются гроздьями или беспорядочно. Среди них встречаются патогенные и условно-патогенные бактерии, такие как *Staph. aureus*;
- *диплококки (Diplococcus)* образуют попарно соединенные кокки;

- *стрептококки (Streptococcus)* — кокки, расположенные в виде цепочки; среди патогенных встречаются возбудители мьта лошадей, скарлатины; в молочной промышленности имеют значение молочнокислые стрептококки, применяющиеся для приготовления кисломолочных продуктов;
- *тетракокки (Tetracoccus)* делятся в двух взаимноперпендикулярных плоскостях и располагаются по четыре, в большинстве своем сапрофиты;
- *сарцины (Sarcina)* — кокки, образующие правильные пакеты по 8–16 клеток.

Палочковидные бактерии (*Bacterium*) — самая большая группа прокариот, которая делится на два вида:

- палочки, не образующие споры (истинные вегетативные бактерии);
- образующие споры — бациллы (*Bacillus*). Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, называют клостридиями (*Clostridium*).

Извитые бактерии делятся на:

- *вибрионы* — бактерии, тело которых представляет неполный завиток в виде запятой (холерный вибрион);
- *спириллы* — бактерии, тело которых состоит из нескольких крупных завитков;
- *спирохеты* — бактерии, тело которых состоит из множества плотно уложенных завитков вокруг центральной осевой нити, невидимых в световой микроскоп (возбудители лептоспироза, сифилиса).

План работы.

1. Ознакомиться с лабораторией кафедры микробиологии и расписаться в журнале о знании правил техники безопасности.

2. Подготовить посуду, консерванты, инструменты и материалы для отбора проб патологического материала.

3. Изучить устройство микроскопа и освоить правила работы с ним.

4. Изучить микрокартину готовых окрашенных препаратов с применением иммерсионной системы микроскопа. Ознакомиться с различными формами бактерий; зарисовать микрокартину.

5. В ходе работы уяснить значение конденсора, диафрагмы и других частей осветительного аппарата, с этой целью провес-

ти микроскопию с опущенным конденсором; с поднятым конденсором; с прикрытой диафрагмой.

6. Освоить правила работы с иммерсионной системой микроскопа. Провести микроскопию окрашенного препарата, применить 90-кратный объектив с иммерсионным маслом и без масла — найти разницу.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные правила техники безопасности при работе в бактериологической лаборатории с исследуемым материалом.
2. Назовите методы исследований, применяемые при микробиологической диагностике инфекционных болезней животных.
3. С какой целью применяется световой микроскоп?
4. В чем заключается разница в ходе лучей в сухой и иммерсионной системах микроскопа?
5. Назовите основные формы бактерий.

ТЕМА 2

Бактериологические краски. Методика приготовления препарата для микроскопии. Простой метод окрашивания

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

Материальное обеспечение: набор сухих бактериологических красок в заводской упаковке; набор рабочих растворов красок во флаконах для простого метода окрашивания: метиленовая синь, разведенный фуксин; спиртовки, предметные стекла; микроскопы, иммерсионное масло; бактериологические петли, банки с дезраствором; пробирки с сенным настоем, содержащим *Bac. subtilis* (непатогенная сенная палочка), и пробирки с непатогенной кишечной палочкой в МПБ; таблицы: «Основные формы бактерий», «Микрофлора зубного налета».

Исследуемым материалом в бактериологии являются:

а) для прижизненной диагностики — кровь, гной, выделения;

б) для посмертной диагностики — кусочки паренхиматозных органов;

в) в санитарной микробиологии — продукты животного происхождения: мясо, молоко, яйца, рыба и т. д.

Все работы ведутся в условиях бокса над пламенем спиртовки, чтобы исключить загрязнение исследуемого материала и окружающей среды. Материал берут в объеме бактериологической петли и наносят на предметное стекло, которое должно

быть чистым и обезжиренным. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно, на плохо обезжиренном — собирается в капельки.

Бактериологические краски.

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

Различают *основные* и *кислые* краски. У основных красителей ионом, придающим бактериальной клетке окраску, служит катион, у кислых — анион. Клеточные структуры бактерий, взаимодействующие с красителем, заряжены преимущественно отрицательно и поэтому лучше воспринимают основные красители, к которым относятся: генцианвиолет; кристаллический фиолетовый; красные — основной фуксин, сафранин; метиленовая синь; малахитовый зеленый

Анилиновые краски, применяемые в микробиологии, имеют порошкообразный или кристаллический вид. Они плохо растворяются в воде, поэтому вначале готовят насыщенные спиртовые растворы красок (1:10), из которых затем получают рабочие водные растворы. Для повышения проницаемости красок в клеточную стенку бактерий в некоторые растворы добавляют щелочь, карболовую кислоту (фенол). В бактериологической практике чаще применяют следующие краски:

- *щелочная метиленовая синь* (синька Леффлера); применяется для простого метода окрашивания, она всегда должна находиться на столе у бактериолога;
- *карболовый основной фуксин Циля* — концентрированная краска, хранится долгое время; применяется при окрашивании трудно прокрашивающихся бактерий, таких как возбудитель туберкулеза, споры бактерий (краска красного цвета);
- *разведенный фуксин* (фуксин Пфейффера) — фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:10; применяется для простого метода окрашивания или как один из компонентов окраски по Граму, краску готовят перед применением и используют в течение одного рабочего дня;

- *карболовый генцианвиолет* используют как основной краситель при окраске по Граму, в модификации по Синеву чаще применяют в виде кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных краской и высушенных.
- *раствор малахитовой зелени (1% -ный водный)*, применяемый при окраске бруцелл по Козловскому.

Методика приготовления препарата для микроскопии.

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

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

3. *Фиксация мазка* преследует две цели: прикрепить бактерии к предметному стеклу и убить их, так как убитые микробы лучше окрашиваются (а заодно обезопасить бактериолога, так как среди исследуемых бактерий могут быть и патогенные). Фиксацию мазков проводят одним из двух способов:

- физический метод фиксации заключается в медленном трехкратном проведении предметного стекла с мазком через наиболее горячую часть пламени в общей сложности 2–3 с, в зависимости от толщины стекла (держат мазком вверх); если при прикосновении стекла к руке ощущается легкий ожог, значит, цель достигнута — микробы убиты; не следует перегревать мазок, иначе произойдет деформация формы клеток.
- при химическом методе фиксации препарат погружают на 5 мин в метиловый спирт или на 10–15 мин в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира); этот метод фиксации щадящий, его рекомендуют применять для препаратов, приготовленных из крови или паренхиматозных органов, а

также из сметаны и сливочного масла, так как эфир обезжиривает препарат.

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

Простой метод окрашивания.

При данном методе применяется одна краска. Он позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, а также изучить их морфологию (форму, взаиморасположение).

В качестве исследуемого материала на лабораторном занятии можно использовать взвесь непатогенной культуры кишечной палочки, сенной палочки, находящейся в пробирке с МПБ, или свой зубной налет, взятый спичкой и распределенный на предметном стекле. В микрофлоре зубного налета здорового человека представлены все морфологические группы бактерий, поэтому она является полиморфной: микрококки, стрептококки, стафилококки, извитые и нитевидные формы, молочнокислые палочки, дрожжи и т. д.

Задание студентам: приготовить препарат и окрасить простым методом.

На предметное стекло бактериологической петлей нанести каплю микробной взвеси, распределить очень тонким слоем, высушить на воздухе, зафиксировать и окрасить простым методом.

Методика простого окрашивания заключается в том, что на фиксированный мазок наносят только одну краску — 3–5 капель:

- щелочную метиленовую синь на 5 мин;
- или разведенный фуксин на 3 мин.

Затем краску смывают водой; препарат высушивают фильтровальной бумагой; наносят одну каплю иммерсионного масла и изучают под микроскопом; микрокартину зарисовать, обратить внимание на разные формы бактерий и обозначить их.

План работы.

1. Приготовить мазок из зубного налета и окрасить простым методом: разведенным фуксином или метиленовой синью.

2. Приготовить мазок из бактериальной культуры и окрасить простым методом: разведенным фуксином или метиленовой синью.

3. Сравнить оба мазка; обратить внимание на разные формы бактерий; зарисовать микрокартину.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите анилиновые краски, часто применяемые в микробиологии.
2. Что характерно для простого метода окрашивания?
3. Расскажите суть физического и химического методов фиксации препаратов.
4. С какой целью изучают морфологию бактерий?

ТЕМА 3

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ. Окраска по Граму

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

Материальное обеспечение: пробирки со смесью взвеси *E. coli* и *S. aureus* в физрастворе для окраски по Граму; набор красок для окрашивания по Граму; микроскопы, иммерсионное масло, спиртовки, предметные стекла, петли; таблицы «Микрофлора зубного налета», «Окраска по Граму».

Сложные методы окрашивания позволяют установить наличие спор, капсул, внутриклеточных включений, а также окрасить кислотоустойчивые бактерии. Различные виды бактерий имеют разный химический состав и отличаются по строению клеточной стенки, поэтому неодинаково воспринимают окрашивание анилиновыми красками. Избирательное отношение микроорганизмов к различным красителям называют *тинкториальными свойствами*. По тинкториальным свойствам все бактерии разделены на две группы: *грамположительные* и *грамотрицательные*.

Методика окрашивания по Граму.

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

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

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

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

5. Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсионным объективом.

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

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

Отношение бактерий к окраске по Граму изучают для определения вида.

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

План работы.

1. Приготовить препарат из смеси *S. aureus* и *E. coli*; окрасить по Граму.

2. Приготовить препарат из зубного налета и окрасить по Граму.

3. Провести микроскопию препаратов под иммерсионной системой; изучить разнообразие морфологических форм; зарисовать микрокартину.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Чем объясняются тинкториальные различия грамположительных и грамотрицательных бактерий?
2. В чем заключается суть окраски по Граму?
3. Что происходит при воздействии 96% -ным этиловым спиртом?
4. С какой целью изучают отношение бактерий к окраске по Граму?
5. Приведите в качестве примера представителей грамположительных бактерий.

ТЕМА 4

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СПОР И КАПСУЛ, МЕТОДЫ ИХ ОКРАШИВАНИЯ. ИЗУЧЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ

Цель занятия: овладеть методами окрашивания спор и капсул; изучить способы исследования бактерий на подвижность и методы приготовления препаратов «висячая или раздавленная кашля».

Материальное обеспечение: смыв 2–3-суточной культуры вакцинного штамма сибирской язвы или сенной палочки; набор красок для окраски по методу Златогорова, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, петли, вазелин со спичкой, микроскопы, иммерсионное масло; готовые препараты на капсулы, окрашенные по Ольту или Михину; таблицы: «Методика окраски спор по Златогорову», «Методика окраски капсул. Органы движения бактерий».

Биологическое значение образования спор.

Некоторые виды палочковидных бактерий в неблагоприятных условиях внутри материнской клетки образуют споры (эндоспоры). Неблагоприятными условиями для бактерий являются:

- недостаток влаги и питательных веществ;
- избыток продуктов метаболизма;
- старение бактериальной культуры.

Чаще споры образуют почвенные микроорганизмы, поэтому почва является резервуаром спорообразующих бактерий и источником загрязнения продуктов животного происхождения (*Bac. anthracis*, *Bac. subtilis*, *Cl. perfringens*). У бактерий

в стадии споры прекращаются все физиологические процессы, и она переходит в анабиоз. При изменении условий — появлении пищи и влаги — активизируются ферменты и споры прорастают в вегетативную форму, для которой характерны все физиологические проявления жизни: питание, дыхание и размножение.

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

Все бактерии, образующие споры, называются *бациллы*. Палочки, у которых диаметр спор превышает ширину вегетативной клетки, принято называть *кlostридиями* (веретенообразные). Бациллы бесконечно долго сохраняются в почве (возбудитель сибирской язвы), устойчивы при обработке кислотами и щелочами, выдерживают кипячение (возбудители столбняка, ботулизма), имеют плотную оболочку и простым методом не окрашиваются. Поэтому для окраски спор применяют сложные методы окрашивания, основанные на применении горячих концентрированных красок, при этом споры и вегетативные клетки сначала окрашиваются в один цвет. При последующем обесцвечивании кислотой споры, являясь кислотоустойчивыми, сохраняют цвет первой краски, а вегетативные клетки обесцвечиваются, поэтому их окрашивают дополнительно.

Методика окрашивания спор по Златогорову.

1. Готовится мазок из 2–3-дневной бульонной культуры спорообразующих бактерий (сенная палочка *B. subtilis*, вакцинный штамм *B. anthracis*).

2. На фиксированный мазок наносится карболовый фуксин и красится при подогревании над пламенем спиртовки 7–10 мин до появления пара. В красный цвет окрашиваются и споры и вегетативные клетки.

3. Препарат обесцвечивают 2% -ным раствором серной кислоты 1–3 с (за это время должны обесцветиться только вегетативные клетки).

4. Далее препарат обильно промывается водой, чтобы прекратить действие кислоты.

5. Обесцвеченные вегетативные клетки дополнительно окрашиваются метиленовой синью 4–5 мин.

Микрокартина: споры — красные, вегетативные клетки — синие.

Наличие или отсутствие споры изучают для определения вида.

Биологическое значение образования капсул.

Некоторые патогенные бактерии, находясь в организме больного, образуют слизистый слой вокруг клеточной стенки. Данный слой называется капсулой, которая имеет консистенцию геля. Ее наличие отмечают у возбудителей сибирской язвы, диплококковой септицемии. У вирулентных бактерий, находящихся в организме животного, капсула является фактором агрессии, так как защищает бактерии от воздействия фагоцитов и специфических антител, поэтому заболевание протекает особенно тяжело.

Во внешней среде капсула защищает почвенные бактерии от высыхания и внедрения бактериофагов.

Среди молочнокислых бактерий имеются штаммы, образующие капсулу, благодаря чему продукт приобретает слизистую, тягучую консистенцию, эта особенность обычно отражается в названии штамма. У различных бактерий химический состав капсул различен, что позволяет дифференцировать их друг от друга при идентификации. Так, капсульное вещество сибиреязвенной палочки содержит полипептид D-глутаминовой кислоты, а диплококковой септицемии — полисахарид.

Вещество капсулы обычно воспринимает красители слабее, чем другие клеточные структуры, поэтому при специальных методах капсула окрашивается в другой цвет, что позволяет выявить ее наличие.

Методика окраски капсул по методу Ольта.

1. На фиксированный препарат-отпечаток, приготовленный из исследуемого материала, наносится 2% -ный водный раствор сафранина.

2. Далее препарат окрашивают при подогревании в пламени спиртовки 2–3 мин, не допуская кипения красителя.

3. Краска смывается водой.

Микрокартина: капсула — желтая, тело бактерий — кирпично-красное.

Исследование бактерий на подвижность.

Некоторые бактерии имеют органы движения — жгутики, тончайшие нити диаметром 0,02–0,05 мкм, длиной до 10 мкм. Количество и характер расположения жгутиков у бактерий различен. Под световым микроскопом жгутики не видны, так как их размеры лежат за пределами разрешающей способности микроскопа, для детального изучения применяют электронный микроскоп. Их наличие можно определить косвенным путем, изучая бактерии в живом состоянии: если они подвижны, активно пересекают поле зрения, значит, у них есть органы движения. По расположению жгутиков на теле микробной клетки их можно разделить на четыре группы.

1. *Монотрихи* — бактерии с одним жгутиком на конце; передвигаются прямолинейно.

2. *Лофотрихи* — бактерии с пучком жгутиков на одном конце.

3. *Амфитрихи* — пучок жгутиков расположен на обоих полюсах клетки или два пучка жгутиков по полюсам.

4. *Перитрихи* — бактерии со жгутиками по всей поверхности тела; передвигаются хаотично.

Извитые формы бактерий — спираиллы и спирохеты — не имеют жгутиков и активно передвигаются за счет изменения конфигурации тела.

Методика приготовления препарата «висячая капля».

Выращивают молодую 12–16-часовую бульонную культуру изучаемых бактерий, смазывают вазелином края лунки на специальном предметном стекле, наносят каплю взвеси в центр покровного стекла. Предметное стекло с лункой переворачивают и накладывают на покровное стекло так, чтобы оно прилипло, а капля оказалась в центре лунки. Затем его осторожно еще раз перевертывают покровным стеклом вверх, чтобы капля *висела* в центре герметично закрытой лунки. Под 8-кратным объективом находят край капли, в этом состоянии фиксируют предметное стекло клеммами и меняют объектив на 40-кратный, а затем и на 90-кратный. Коэффициент преломления (КП) тела микробной клетки незначительно отличается от КП окружающей среды, поэтому для более контрастного изображения объекта надо затемнить поле зрения, прикрыв диафрагму и

опустив конденсор на оптимальную высоту. Подвижность хорошо видна уже при 400-кратном увеличении. При активном движении бактерии с помощью жгутиков меняют место положения и пересекают все поле зрения. Старая по возрасту культура малоподвижна, при внимательном изучении можно заметить активность только некоторых ее клеток (не путать с броуновским движением, когда бактерии совершают просто колебательные движения).

Для приготовления препарата «раздавленная капля» в центр обычного предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры и накрывают покровным стеклом, при этом необходимо рассчитать объем капли так, чтобы она не вытекала за края покровного стекла. Микроскопию проводят по обычной методике, но прикрыв диафрагму и спустив конденсор.

Имеются и прямые методы обнаружения жгутиков. Например, *метод серебрения по Морозову* для обнаружения жгутиков основан на искусственном увеличении размеров жгутиков за счет наслоения на них аммиачного серебра. Во время микроскопии видны коричневые бактерии со жгутиками на желтом фоне.

Но на практике в микробиологических лабораториях чаще применяют косвенные методы и выявляют жгутики у бактерий в чистой культуре приготовлением препарата «висячая капля» или «раздавленная капля».

План работы.

1. Приготовить препарат из спорообразующих бактерий (можно окрасить *Bac. subtilis* — сенную палочку из сеного настоя); окрасить по Златогорову; изучить под микроскопом; обратить внимание на дифференциацию спор от вегетативных клеток по цвету.

2. Провести микроскопию демонстрационного препарата, окрашенного по Ольту, приготовленного из селезенки белой мыши, погибшей от сибирской язвы. Обратит внимание на короткие цепочки из палочек, окруженных капсулой.

3. Провести микроскопию готового препарата, приготовленного из культуры капсулообразующих бактерий (например, слизистый штамм молочнокислых бактерий из кисломолочных продуктов); обратить внимание на наличие капсулы.

4. Освоить методы приготовления препаратов «висячая капля» или «раздавленная капля» из сенного настоя или непатогенной бульонной культуры *E. coli*.

5. Провести микроскопию препарата «висячая капля» под 8- и 40-кратными объективами с прикрытой диафрагмой и опущенным конденсором.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какое биологическое значение имеет спорообразование?
2. Как называются бактерии, образующие споры?
3. В чем отличие термина «бацилла» от термина «кlostридия»?
4. Какое биологическое значение имеют капсулы бактерий, находящихся в организме?
5. На чем основан принцип окрашивания спор?
6. На чем основаны косвенные методы определения наличия органов движения жгутиков у бактерий?
7. На чем основаны прямые методы обнаружения жгутиков у бактерий?
8. С какой целью изучают наличие споры, капсулы и жгутиков у бактерий?

ТЕМА 5

Микроскопические грибы: плесневые грибы и дрожжи. Их морфологические особенности

Цель занятия: изучить морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов и дрожжей.

Материальное обеспечение: чашки Петри с посевами микроскопических грибов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, а также пробирка со взвесью пекарских дрожжей в физиологическом растворе. Микроскопы, микологические крючки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, флакончик со смесью воды, спирта и глицерина в равных объемах для приготовления препарата из плесневых грибов.

Микроскопические грибы — хемоорганотрофные микроорганизмы, эукариоты, не содержащие хлорофилла; относятся к царству *Fungi* (лат.) или *Mycota* (греч.), включающему в себя около 120 тыс. видов. Широко распространены в природе — почве, воде, растениях, продуктах питания. Дифференциация плесневых грибов и дрожжей иногда затруднена, так как есть переходные формы, различия между которыми почти неуловимы. В качестве критерия, отличающего дрожжевую клетку от плесеней, используют способность плесеней образовывать длинные, разветвленные нити-гифы.

Вегетативное тело гриба состоит из ветвящихся нитевидных гифов, переплетение которых образует мицелий, или грибницу. Различают субстратный мицелий, находящийся в глубине питательной среды, и воздушный, возвышающийся над средой, часто несущий специальные органы размножения. По строению мицелия грибы подразделяют на два класса — *низшие* и *высшие*.

У низших грибов мицелий несептирован и представлен одной разветвленной клеткой, иногда с несколькими ядрами и без перегородок.

У высших грибов мицелий септирован, в гифах имеются перегородки (септы), разделяющие их на отдельные клетки.

Микроскопические грибы размножаются вегетативными и репродуктивными методами при помощи спор, а также половым способом.

Морфологические и культуральные свойства представителей низших и высших грибов.

Mucor, или головчатая плесень, относится к типичным представителям фикомицетов (низших грибов).

Мицелий мукора состоит из одной разветвленной клетки, от которой вертикально отходят воздушные гифы — спорангиеносцы, заканчивающиеся черными круглыми спорангиями (головками), поэтому его иногда называют «головчатая плесень». После созревания и разрыва спорангия многочисленные эндоспоры заражают все вокруг, попадая на поверхность пищевых продуктов и кормов, покрывая всю поверхность черной пушистой массой, видимой невооруженным глазом. Активный рост прекращается при 5–8°C.

К самым известным представителям микомицетов (высших грибов) относятся грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*.

Penicillium — плесень-кистевик, имеющий ветвящийся, септированный мицелий. При микроскопии препаратов из мицелия видны конидиеносцы, имеющие на верхушке мутовки, из которых выходят цепочки конидий (экзоспор). Пенициллы хорошо развиваются при достаточной аэрации и влажности на всех пищевых продуктах и кормах. Пустоты внутри и поверхность продуктов покрываются зеленоватой бархатистой плесенью, вызывающей порчу продукта, придающей привкус плесени.

Aspergillus — леечная плесень, имеет септированный мицелий. При микроскопии видны конидиеносцы, заканчивающиеся булавовидным расширением, окруженным стеригмами, из которых выходят цепочки конидий. Аспергиллы хорошо развиваются на мясных и молочных продуктах, на поверхности которых появляются колонии зеленой плесени.

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

Cladosporium. При микроскопии виден септированный мицелий и конидиеносцы, на питательном субстрате образуют коричневые или черные бархатистые колонии. На воздушных гифах мицелия формируются овальные, расположенные в цепочку споры. Хорошо растут при низких температурах и обладают высокой протеолитической активностью. Находясь на поверхности мяса, мясных продуктах, эта плесень проникает в толщу мышечной ткани.

Плесень этого рода вызывает внутреннее плесневение масла (образование черных пятен) при наличии внутренних пустот. Может вызвать порчу сыра и яичных продуктов.

Среди грибов рода *Fusarium* есть сапрофиты, которые живут в почве и на растительных остатках, а патогенные паразиты вызывают заболевания многих видов растений — увядание, гниль корней, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян.

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

Oidium lactis на питательной среде образуют белый септированный мицелий. Оидии, в виде овальных клеток, отделяются непосредственно от кончиков мицелия. Молочная плесень имеет вид белого пушистого налета, появляется на поверхности молочных продуктов — сметане, твороге, кефире, в результате чего происходит снижение кислотности, приводящее к активизации гнилостных бактерий и порче продукта.

При длительном хранении при низкой температуре могут развиваться схожие с *Oidium lactis* другие плесневые грибы, такие как *Candida* и *Oospora*.

Alternaria. От основных нитей мицелия гриба отходят короткие конидиеносцы, заканчивающиеся грушевидными или заост-

ренными многоклеточными конидиями, окрашенными в оливковый, бурый цвет. Плесени этого вида могут развиваться на охлажденном и замороженном мясе, масле и других продуктах.

Особенности культивирования плесневых грибов.

Для выращивания микроскопических грибов применяют специальные питательные среды — Сабуро, Чапека.

При первичном выделении грибов из исследуемого материала в питательные среды для подавления сопутствующей микрофлоры добавляют пенициллин из расчета содержания антибиотика 50 или 100 ед. в 1 мл среды, а стрептомицина — 0,1 г на 1 мл среды. Питательные среды с антибиотиками готовят непосредственно перед использованием, добавляя к расплавленной и охлажденной до 50°C питательной среде растворы антибиотиков. Подозрительный по качеству исследуемый материал (пищевые продукты, корма, зерно) вносят на поверхность питательной среды в чашке Петри, выращивают при 28°C в течение 5–8 дней. Для каждого вида гриба характерны свои культуральные особенности. Являясь строгими аэробами, они образуют на поверхности питательной среды крупные бархатистые, войлочные или кожистые колонии различной пигментации. По мере появления колоний изучают морфологические и культуральные свойства для дифференциации плесневых грибов.

Особенности изучения морфологии плесневых грибов.

Методика: на предметное стекло наносят каплю смеси, состоящей из равных объемов воды, спирта и глицерина. При помощи бактериологической петли и препаровальной иглы в эту каплю вносят часть мицелия изучаемых плесневых грибов, осторожно прикрывают покровным стеклом, находят объект под 8-кратным объективом, а изучают под увеличением в 400–900 раз. Микроскопические грибы не окрашивают, их изучают в нативном виде, поэтому при микроскопии препарата для увеличения контрастности, необходимо опустить конденсор и прикрыть ирисовую диафрагму (режим высоты конденсора и диаметр диафрагмы меняют до появления четкого изображения). При микроскопии препарата обращают внимание на наличие перегородок в гифах, отмечают особенности строения органов спороношения, так как только по ним можно определить родовую и даже видовую принадлежность.

Дрожжи — одноклеточные организмы округлой или удлинённой формы, с двухконтурной оболочкой и дифференцированным ядром. Их размножение происходит почкованием, половым путем, некоторые размножаются при помощи спор. В асках образуется от 4 до 12 спор. Оптимальной является температура 20–30°C, но многие из них способны развиваться при 10°C и вызывать порчу продуктов. Дрожжи широко распространены в природе: почве, растениях, в воздухе, откуда они попадают на пищевые продукты и являются виновниками их порчи. В зависимости от вида дрожжей в продуктах происходит сбраживание углеводов, появляется прогорклый вкус у масла. Некоторые виды дрожжей способны развиваться даже в средах, содержащих 24% NaCl.

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

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

S. minor применяют преимущественно при выпечке ржаного теста. Клетки мелкие — 1,5–3 мкм, круглой формы, характерны фигуры почкования по 3–7 клеток. Оптимальная температура развития — 25–28°C. Отличаются кислотоустойчивостью, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Род *Saccharomyces ellipsoideus* (*S. vini*) — дрожжи, как показывает название, эллипсоидной формы. Их используют преимущественно в виноделии, этот вид дрожжей также представлен многими расами.

Но эти и некоторые другие виды рода *Saccharomyces* при случайном попадании в сырье и пищевые продукты, содержа-

щие легко сбраживаемые углеводы, вызывают их порчу — скисание и брожение.

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

Для изучения морфологии дрожжей на лабораторном занятии можно использовать взвесь пекарских дрожжей в физрастворе, которые равномерно распределяют тонким слоем на предметном стекле, фиксируют физическим методом и окрашивают метиленовой синью в течение 3–5 мин. Дрожжевые клетки располагаются одиночно, имеют овальную форму, в молодой культуре часто обнаруживают почкующиеся дрожжи. Обратите внимание, что морфологию дрожжей можно изучать уже при 400-кратном увеличении.

При бактериологическом контроле качества дрожжевой закваски необходимо изучить их под иммерсией, так как при этом увеличении в загрязненной закваске можно обнаружить между крупными дрожжевыми клетками сопутствующую микрофлору, изучить ее и определить источники загрязнения по ходу технологического процесса.

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

Методика: каплю взвеси изучаемой дрожжевой закваски наносят на предметное стекло и в нее добавляют каплю раствора Люголя. Каплю накрывают покровным стеклом, и получается препарат «раздавленная капля», ее микроскопируют и изучают при увеличении в 400 и 900 раз.

Микрокартина: гликогеноподобные полисахариды окрашиваются раствором Люголя в красновато-бурый цвет, а крахмалоподобное вещество (гранулеза) — в синий. Реакция на гликоген идет только в кислой среде, поэтому перед выявлением его в клетке среду, где выращивали дрожжи, подкисляют.

Количество дрожжевых клеток с гликогеном в закваске должно составлять не менее 70% от общего числа. Отсутствие гликогена в клетках дрожжей свидетельствует о том, что дрожжи незрелые, и перед применением такой закваски в производство ее надо освежить добавлением питательных веществ.

План работы.

1. Визуально и при помощи лупы изучить культуральные свойства плесневых грибов, выросших на демонстрационных посевах в чашках Петри. Обратит внимание на культуральные свойства грибов, особенности строения мицелия — войлочный, бархатистый; наличие пигмента — зеленый, черный, оливково-бурый.

2. Приготовить препарат из мицелия плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*; провести микроскопию; изучить морфологию; найти представителей одноклеточных и многоклеточных грибов, органы их спороношения — конидиеносцы, микрокартину зарисовать.

3. Приготовить препарат из взвеси пекарских дрожжей; окрасить простым методом; изучить микрокартину; найти почкующиеся дрожжевые клетки; зарисовать микрокартину. Обратит внимание на наличие бактериальной микрофлоры, которая является загрязняющей или сопутствующей.

4. Провести определение гликогена в дрожжевой клетке.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие морфологические особенности характерны для низших и высших микроскопических грибов?
2. Какие способы размножения характерны для плесневых грибов?
3. С какой целью в питательные среды добавляют антибиотики при культивировании плесневых грибов?
4. Какой морфологический признак является характерным для дрожжей?
5. С какой целью определяют наличие гликогена в дрожжевой клетке?

ТЕМА 6

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПОСУДЫ

Цель занятия: изучить методы стерилизации, применяемые в микробиологической практике; ознакомиться с правилами работы с электрическим сушильным шкафом, автоклавом, аппаратом Коха, прибором Зейтца.

Материальное обеспечение: автоклав, электрический сушильный шкаф, текучепаровой аппарат Коха, стерилизатор с набором инструментов, колба Бунзена, фильтр Зейтца, фильтры из асбеста и нитроцеллюлозы, твердые фильтры из белой глины; таблица «Методы стерилизации».

Под стерилизацией понимают полное уничтожение всех жизнеспособных микроорганизмов (вегетативных, споровых) в стерилизуемом объекте с помощью высокой температуры, химических веществ и других факторов.

Главными требованиями ко всем методам стерилизации являются их надежность и сохранение первоначальных свойств стерилизуемого объекта. В связи с большим разнообразием качества стерилизуемых объектов разработаны различные методы стерилизации. При выборе метода стерилизации необходимо учитывать качество стерилизуемого объекта, возможные изменения его свойств под влиянием силы излучения, высокой температуры, химических реагентов и т. д.

Различают физический, химический и механические методы стерилизации. К физическим методам стерилизации относят действие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей (УФ), ионизирующей радиации, ультразвука. Химические

методы применяют для обработки вакцин, сывороток и других биопрепаратов, консервируемых различными антисептиками. Механический метод рекомендуют для фильтрации жидкостей, которые нельзя нагревать. Для этого применяют специальные бактериальные фильтры, в порах которого остаются бактерии, но вирусы проходят.

Физические методы стерилизации.

I. Термическая обработка.

1. *Стерилизация в пламени* (в условиях лаборатории чаще в пламени спиртовки) или *фламбирование* применяются только для обработки мелких инструментов, таких как бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы, пастеровские пипетки (этот метод разрушает ткани, резиновые детали и оборудование).

2. *Стерилизация сухим жаром* проводится в электрических сушильных шкафах при 160°C в течение 2 ч, при 170°C — 60 мин. Этим методом стерилизуют лабораторную стеклянную посуду, предварительно завернутую в бумагу.

3. *Кипячение* в специальных стерилизаторах в течение 30–40 мин применяется для обработки хирургических инструментов, при этом вода должна быть обязательно дистиллированная, для усиления эффекта добавляют 1–2% соды. В последние годы появились разнообразные одноразовые инструменты, но тем не менее стерилизация методом кипячения находит применение. Недостатком этого метода является то, что есть споры, выдерживающие такой режим обработки.

4. *Стерилизация паром*. Различают обработку паром под давлением в герметично закрывающихся автоклавах и текучим паром в аппарате Коха.

Стерилизация паром под давлением проводится в автоклаве, который представляет собой двустенный металлический котел с герметично завинчивающейся крышкой. Между стенками всегда должна находиться вода, во время кипения которой образуется пар, поступающий в рабочую камеру. Давление внутри автоклава показывает манометр. На шкале манометра обозначается только избыточное давление, нормальное давление соответствует показанию «0». Работа с автоклавом требует строгого выполнения правил и техники безопасности, предусмотренных специальной инструкцией.

Через воронку налить дистиллированную воду до метки и закрыть кран. Загрузить стерилизационную камеру и герметично закрыть. Включить нагревательную систему автоклава при открытом паровыпускающем кране; дождаться появления непрерывной сухой струи пара, свидетельствующей о том, что весь воздух из рабочей камеры вытеснен, и только после этого перекрыть паровыводящий кран. Далее продолжается нагревание, и образующийся пар не находит выхода, поэтому давление возрастает (показатели манометра).

Во время работы автоклава наблюдают за показателями двух манометров: один из них показывает давление в рабочей камере, другой автоматически поддерживает заданный режим работы.

При давлении в 0,5 атм. температура в автоклаве равна 110–112°C; в 1,0 атм. — 120–121°C; в 1,5 атм. — 126–128°C; в 2,0 атм. — 132–134°C. Длительность работы с момента достижения заданного режима продолжается 20–30 мин.

Электронагревательные приборы выключают после окончания стерилизации. Крышку автоклава открывают, соблюдая технику безопасности, только после того, как давление упадет до нуля.

При автоклавировании на бактерии губительно действуют одновременно высокая температура и давление, поэтому автоклавирование является самым надежным методом стерилизации. Эффективность стерилизации можно проверить, помещая в автоклав реактивы с известной точной точкой плавления или пробирки, содержащие термофильные спорообразующие бактерии, которые проверяют посевом в стерильные питательные среды. После выдерживания в термостате среды должны остаться стерильными.

В автоклаве стерилизуют питательные среды, физраствор, посуду, отработанные бактериальные культуры, халаты, вату, бинты.

Дробная стерилизация текучим паром проводится в аппарате Коха или в автоклаве с открытым паровыводящим краном, т. е. появляющийся пар не накапливается, а удаляется через открытые краны постоянно, поэтому температура выше 100°C не поднимается. Данный метод стерилизации рекомендуют применять для питательных сред (с углеводами, желатином), которые изменяют свои свойства при нагревании

выше 100°C. Режим работы: три дня подряд по 40 мин с момента достижения 100°C. Суть сводится к тому, что при первом прогревании вегетативные клетки погибают, а споры остаются (предполагается, что они в течение суток прорастут). Повторное прогревание на второй день вновь убивает проросшие вегетативные клетки. Третье проводят для большей надежности, при этом погибают все вновь появившиеся вегетативные клетки.

Для стерилизации питательных сред, содержащих белки, применяют процесс *тиндализации*, который проводят в водяной бане при 60–65°C по часу в течение пяти дней.

5. *Пастеризация (частичная стерилизация)* — прогревание при температуре ниже 100°C. Например, молоко пастеризуют при 74–76°C в течение 20 с. Цель пастеризации — уничтожение патогенных бактерий (возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, вируса ящура), а также гнилостных и молочнокислых бактерий, являющихся виновниками порчи продуктов. После пастеризации молоко сразу охлаждают до 4°C, чтобы предотвратить размножение оставшейся термофильной и споровой микрофлоры. Пастеризовать рекомендуют соки, пиво, вино, которые нельзя прогревать при более высокой температуре, так как происходит снижение биологической ценности пастеризуемого продукта.

II. Облучение электромагнитными волнами.

1. *Ультрафиолетовые лучи* (длиной 250–270 нм), подавляющие репликацию ДНК, широко применяются для санации воздуха в животноводческих помещениях, в цехах молочных заводов, в микробиологических боксах для создания асептических условий. Для дезинфекции воздуха применяют лампы низкого давления типа БУВ-15, БУВ-60.

2. *Ионизирующая радиация* (холодная стерилизация) поражает генетический аппарат микробной клетки. Гамма- и рентгеновское облучение применяют для уничтожения микроорганизмов на пластмассовых изделиях одноразового применения, перевязочных материалах, биопрепаратах (при этом не снижается их качество).

3. *Действие ультразвука* заключается в дезинтеграции цитоплазматических структур микроорганизмов. Применяют для стерилизации пищевых продуктов (молока, воды).

Химические методы.

Химические вещества могут ингибировать (тормозить) или полностью подавлять рост микроорганизмов, поэтому их можно применять с целью профилактики микробного загрязнения питательных сред, вакцин, диагностических и лечебных сывороток.

Вакцины и лечебные сыворотки консервируют карболовой кислотой (0,5%), формалином (0,5%), мертиолятом (1:5000).

Диагностические агглютинирующие сыворотки консервируют, добавляя 1,5% хлороформа, который при применении улетучивается, борной кислотой, глицерином.

Мелкую стеклянную посуду, пипетки, предметные стекла дезинфицируют, погружая в 10%-ный раствор H_2O_2 , 70%-ный этиловый спирт, 5%-ный раствор карболовой кислоты или щелочи.

Для дезинфекции в лабораторной практике применяют 3–5%-ные растворы карболовой кислоты, хлорамина.

Механические методы.

Эти методы основаны на *фильтрации* жидкостей через специальные бактериальные фильтры, которые задерживают видимые под микроскопом микроорганизмы. Через них свободно проходят вирусы и микоплазмы, поэтому данные методы следует признать лишь как «частичную» стерилизацию.

Механические методы стерилизации рекомендуется применять для биологических жидкостей, которые нельзя прогревать, например, сыворотку крови, растворы витаминов, белки, дрожжевые экстракты.

Бактериальные фильтры имеют различную форму и изготавливаются из различных материалов. Они отличаются по величине пор, диаметр которых указан в прилагаемой инструкции.

В микробиологической практике широко используются *фильтры-свечи*, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка («свечи Шамберлана»), из инфузورной земли («свечи Беркефельда») с различным диаметром пор, в которых фильтрация происходит только под давлением.

Особенно широкое применение нашли так называемые *мембранные фильтры-диски* различного диаметра, толщиной 0,1 мм, изготовленные из асбеста, коллодия, нитроцеллюлозы

(они рассчитаны на одноразовое применение). Фильтры монтируют в прибор Зейтца, который состоит из приемного стакана-воронки, металлической сетки, на которую помещают фильтровальную бумагу, затем собственно фильтр и колбы Бунзена. Перед работой собранный прибор завертывают в бумагу и стерилизуют автоклавированием (300 мин при 110°C). Жидкость, подлежащую стерилизации, наливают в воронку прибора, внутри колбы создают вакуум, и жидкость проходит через фильтры, освобождаясь от бактерий, попадает в приемную колбу Бунзена.

План работы.

1. Ознакомиться с оборудованием кафедры (горизонтальным и вертикальным автоклавами, электрическим сушильным шкафом, аппаратом Коха); правилами работы; техникой безопасности при работе с этими приборами.

2. Провести демонстрацию фильтрации воды через фильтр из нитроцеллюлозы, применив прибор Зейтца, вмонтированный в колбу Бунзена (в ней должен быть создан вакуум). Ознакомиться с твердыми фильтрами в виде свечи.

3. Провести кипячение с целью стерилизации МПА и МПБ в пробирках, которые необходимо поставить в термостат на 24 ч; на следующем занятии проверить результаты и убедиться, что спорообразующие остались и проросли (в МПА и МПБ должны появиться признаки роста).

4. Приготовить 3%-ный раствор карболовой кислоты и 3%-ный раствор хлорамина, разлить в широкие сосуды и погрузить в них пипетки.

5. Посетить бокс; ознакомиться с работой ультрафиолетовых ламп.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью применяется стерилизация?
2. Что учитывают при выборе метода стерилизации?
3. На чем основаны физические методы стерилизации?
4. На чем основаны механические методы стерилизации и для каких сред они рекомендуются?
5. Назовите недостатки таких методов стерилизации, как кипячение и пастеризация. Чем это объясняется?
6. Какой метод стерилизации самый надежный?

ТЕМА 7

Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов, их классификация

Цель занятия: сформировать у студентов представление о назначении обычных (общеупотребительных), специальных, дифференциально-диагностических и элективных питательных сред; изучить способы приготовления питательных сред; ознакомить студентов с методами культивирования микроорганизмов.

Материальное обеспечение: компоненты для приготовления питательных сред — сухой агар-агар, пептон, поваренная соль, желатин. Набор готовых жидких и плотных питательных сред в пробирках, чашках. Образцы сухих питательных сред в фабричной упаковке. Лабораторные весы, разновески, химические стаканы, мензурки, колбы с дистиллированной водой, электроплитка; таблица «Классификация питательных сред».

Характеристика и классификация питательных сред.

В микробиологических лабораториях готовят питательные среды для выращивания микроорганизмов с учетом их физиологических потребностей, содержащие различные вещества, необходимые для размножения и роста микроорганизмов.

Ко всем питательным средам предъявляются общие требования.

1. Питательные среды должны быть стерильные.
2. Питательные среды должны быть влажные, так как микроорганизмы питаются поверхностью тела путем осмоса и диффузии, а продукты метаболизма выделяются только в растворенном виде.

3. Для большинства бактерий благоприятной является рН в пределах 7,2–7,4.

4. Питательные среды должны содержать все питательные вещества, источники углерода и азота (пептон), обеспечивающие оптимальный рост.

5. Некоторые питательные среды должны быть прозрачными.

6. Для анаэробных бактерий готовят питательные среды, изолированные от воздуха слоем вазелинового масла.

В табл. 3 представлена классификация питательных сред. Из данных, представленных в ней, видно, что в состав естественных сред входят растительные компоненты: экстракты овощные, соевые, гороховые; животного происхождения: экстракты из мяса, сыворотки крови, яйца, молоко, которые можно отнести к средам неопределенного химического состава. Из этой группы сред широко применяются МПБ (мясопептонный бульон), МПА (мясопептонный агар), РПБ (рыбопептонный бульон).

Синтетическими называют среды, в состав которых вводят физиологически обоснованные количества химически чистых элементов, углеводов, незаменимых аминокислот, витамины, различные минеральные вещества, такие среды относят к средам известного химического состава. При изучении метаболических потребностей микроорганизмов в питательные среды вводят радиоактивно меченые углерод и фосфор.

Таблица 3

Классификация питательных сред

По составу	По физическим свойствам	По назначению
<i>Естественные:</i> в их состав входят компоненты животного и растительного происхождения — мясо, яйца, картофель, сенной настой, отвары из зерновых	Жидкие — МПБ Плотные — МПА Полужидкие (0,3–0,7% агара)	Основные (обычные, общепотребительные) Специальные
<i>Синтетические:</i> в их состав включают химически чистые компоненты, содержащиеся в строго определенных количествах	Сухие имеют вид порошка, из которого по прописи готовят жидкие и плотные питательные среды (находятся в фабричной упаковке)	Дифференциально-диагностические Элективные (накопительные)

Как видно из табл. 3, по назначению питательные среды делят на: основные (обычные, общеупотребительные); специальные; дифференциально-диагностические; элективные (накопительные, избирательные).

К **основным (общеупотребительным) питательным средам** относятся МПБ, МПА. На них растут многие нетребовательные микроорганизмы — *E. coli*, *S. aureus*, *Bac. anthracis*.

Основой многих питательных сред является *мясная вода*: говядину хорошего качества освобождают от костей, жира и измельчают в мясорубке. 1 кг полученного фарша заливают 2 л водопроводной воды, кипятят 60 мин (можно предварительно экстрагировать в условиях холодильника 16–18 ч, потом кипятить). Далее мясную воду охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доливают воду до первоначального объема. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, бумажными колпаками и стерилизуют 20 мин при 120°C в автоклаве, приготовленную мясную воду используют как один из компонентов при приготовлении МПБ и других сред. В мясной воде содержится большое количество аминокислот, углеводов, факторов роста, минеральных солей и экстрактивных веществ.

Перевар Хоттингера готовят из мясных отходов путем их триптического гидролиза. Мелко нарезанный материал заливают кипящей водой в соотношении 1:2, кипятят, охлаждают до 45°C и добавляют панкреатин, подщелачивают раствором карбоната натрия до pH 7,8–8,0, встряхивают и добавляют хлороформ (10 мл/л) плотно закрывают, выдерживают 10 сут. в теплом месте и получают продукт гидролиза.

МПБ (мясопептонный бульон). К 1 л мясной воды добавляют 1% пептона и 0,5% химически чистой поваренной соли, устанавливают pH среды 7,4–7,6. Разливают в колбы или пробирки и автоклавируют при 120°C 20 мин. Стерильная среда прозрачная, имеет интенсивно-желтый цвет.

МПА (мясопептонный агар). К 1 л МПБ добавляют 2–3% сухого агар-агара, расплавляют в кипящей водяной бане, разливают в пробирки по 5 мл для приготовления скошенного МПА или по 13–15 мл «столбиком» для последующего разлива в чашки Петри. Приготовленные среды автоклавируют при 1 атм. 20–30 мин. Большим преимуществом этой среды является то, что плотность среды сохраняется и при температуре термостата.

Внедрение плотных питательных сред в бактериологию в свое время оказалось очень важным шагом для получения чистых культур микроорганизмов. Стали применять уплотнители, используемые в кондитерском производстве при изготовлении мармелада и желе. В качестве уплотнителя применяют агар-агар, получаемый из некоторых морских водорослей. Агар-агар — это полисахарид, не имеющий питательных свойств, но придающий питательной среде *плотную консистенцию* при добавлении 2% и *полужидкую консистенцию* при добавлении 0,3–0,5% агар-агара, при этом получается ПЖА (полужидкий мясопептонный агар).

Для нужд микробиологии, промышленность выпускает «бактериологический», «высокоочищенный» агар-агар в виде порошка или тонких прозрачных пластинок.

МПЖ (мясопептонный желатин). Желатин — продукт выварки костей, хрящей и сухожилий, обладающий питательными свойствами. Его выпускают предприятия биологической промышленности в виде порошка и тонких пластинок. Для приготовления МПЖ к 1 л МПБ добавляют 10–20% порошка желатина, после набухания крупинки колбу ставят в кипящую водяную баню для расплавления и разливают по 8–9 мл в пробирки. МПЖ после охлаждения принимает плотную консистенцию при комнатной температуре. Затем его дробно стерилизуют в аппарате Коха или в автоклаве с открытым краном три дня по 20 мин или однократно в автоклаве при 112°C 15 мин.

Особенностью этой среды является то, что выращивание бактерий на МПЖ возможно только при комнатной температуре, так как в термостате она расплавляется (разжижается). Температура плавления желатина — 23–26°C, застывает он при температуре 18–20°C, образуя плотный гель. Недостатком этой среды является то, что при температуре культивирования бактерий она расплавляется. Обычно МПЖ применяют для изучения протеолитических свойств бактерий при комнатной температуре. Под действием протеолитических ферментов, выделяемых бактериями, МПЖ необратимо разжижается.

Бульон Хоттингера: перевар Хоттингера разводят водопроводной водой в соотношении 1:5 и добавляют 0,5% хлорида натрия и 0,1 г гидрофосфата калия; устанавливают pH 7,4–7,6; кипятят 15–20 мин; фильтруют; разливают по пробиркам и стерилизуют 20–30 мин при 120°C.

Некоторые патогенные микроорганизмы при первичном выделении из исследуемого материала очень требовательны к качеству питательных сред. Поэтому для их культивирования применяют **специальные среды**, в состав которых добавляют углеводы, кровь, сыворотку крови, некоторые незаменимые аминокислоты.

Сахарный МПБ и МПА. Чтобы приготовить сахарный МПБ и МПА, к обычным, общеупотребительным средам в колбе добавляют 1% глюкозы, размешивают, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром дробно.

Сывороточный МПБ и МПА. К МПБ в колбе добавляют 5–10% стерильной сыворотки крови, размешивают и разливают по пробиркам. МПА предварительно расплавляют, охлаждают до 50°C и стерильно добавляют 5–10% сыворотки крови, тщательно перемешивают. Полученную среду разливают в чашки Петри, пробирки и охлаждают.

Кровяной МПА. К расплавленному и охлажденному до 50°C МПА в колбе, чашке Петри стерильно прибавляют 5–10% дефибринированной крови (кролика, барана), тщательно перемешивают. На этой среде изучают способность патогенных бактерий вызывать гемолиз эритроцитов.

Сывороточные и кровяные среды готовят непосредственно перед посевом, так как повторно расплавлять эти среды нельзя.

Дифференциально-диагностические среды применяют для первичного выделения возбудителя из исследуемого материала и для дифференциации бактерий друг от друга. При приготовлении дифференциально-диагностических сред к обычной среде добавляют углеводы, индикаторы, а к некоторым еще и ингибиторы, анилиновые краски. При размножении микроорганизмов в дифференциально-диагностических средах происходит изменение цвета индикатора, питательной среды и самих колоний, что позволяет отличать одни виды бактерий от других (среды Гисса, агар Эндо, Левина, Плоскирева и т. д.).

В некоторых случаях, когда предполагается незначительное обсеменение исследуемого материала патогенным возбудителем, например сальмонеллами, проводят подращивание возбудителя для увеличения его численности посевом *в среды обогащения без ингибиторов*, такие как пептонная и буферная вода, МПБ. После появления видимого роста в средах обогащения делают пересев из них в дифференциально-диагностические среды.

Элективные (селективные, накопительные) среды разнообразны и очень сложные по своему составу, могут быть плотными и жидкими. Эти питательные среды рекомендуют применять для накопления и выделения возбудителя из исследуемого материала, обильно обсемененного посторонней микрофлорой, а также для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. В них добавляют ингибиторы (анилиновые краски, желчь, антибиотики), подавляющие рост сопутствующей микрофлоры и обеспечивающие преимущественные условия для размножения выделяемого возбудителя. Жидкие селективные среды в научной литературе еще называют средами *накопления*, их рекомендуют применять, когда в исследуемом материале предполагается незначительное содержание интересующего возбудителя и нужно подавить размножение нежелательной, сопутствующей микрофлоры.

К элективным питательным средам относятся среды для индикации бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

Среды Гиса — это жидкие или полужидкие питательные среды, применяемые для изучения сахаролитических свойств бактерий. Основой данных сред служит 1% -ная пептонная вода, к которой добавляют 0,5% хлорида натрия и 0,5% одного из углеводов (глюкоза, лактоза, сахароза, маннит) и индикатор Андрэде (готовая среда желтого цвета) или индикатор бромтимоловый синий (готовая среда сине-зеленого цвета). Готовую среду разливают в пробирки по 5–6 мл. В пробирки с жидкой средой помещают «поплавки» (мини-пробирки вверх дном) для улавливания образующегося газа; в полужидких средах при наличии фермента, расщепляющего углеводы до конечных продуктов, в глубине среды появляются исчезающие пузырьки газа.

Среда Эндо выпускается в сухом виде. При приготовлении ее в лаборатории к 100 мл МПА прибавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в небольшом количестве воды. В отдельной пробирке к 1 мл спиртового насыщенного основного фуксина добавляют 10% -ный водный раствор сульфида натрия до обесцвечивания фуксина. Приготовленную смесь вливают в растопленный МПА и перемешивают. Готовая среда должна быть бледно-розового цвета, ее не хранят, а сразу разливают по чашкам Петри. Она применяется для дифференциации *E. coli* от *Salmonella*. Только кишечная палочка расщепляет лактозу, входящую в состав агара Эндо, до молочной кислоты, которая подкисляет среду и восста-

навливают обесцвеченный фуксин. Колонии кишечной палочки (эшерихий) в кислой среде приобретают красный цвет с металлическим блеском, а при росте сальмонелл, которые не расщепляют лактозу, рН среды не изменяется, поэтому образуются неокрашенные колонии, что позволяет дифференцировать их друг от друга.

Среда Левина выпускается в сухом виде. При приготовлении ее добавляют к 100 мл расплавленного МПА в указанной последовательности: 2 мл 0,5% -ного водного раствора метиленового синего, 1,5 мл 2% -ного раствора эозина желтого, 2 г лактозы и 0,2 г двуосновного фосфата калия (растворы красок готовят предварительно, стерилизуют текучим паром и хранят впрок). Готовая среда приобретает красно-фиолетовый цвет. Лактозопозитивные бактерии, эшерихии, расщепляющие лактозу, на этой среде образуют колонии, окрашенные в темно-фиолетовый цвет, а сальмонеллы — бесцветные.

Агар Плоскирева выпускается в сухом виде. Предназначен для выделения сальмонелл, содержит лактозу и компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры, т. е. ингибиторы (желчные соли, цитрат натрия, тиосульфат натрия, бриллиантовый зеленый, йод, нейтральный красный). Агар Плоскирева по классификации является одновременно дифференциально-диагностической и селективной средой, поэтому его рекомендуют применять при обильном обсеменении материала сопутствующей микрофлорой. Готовая среда оранжево-красная, колонии сальмонелл бесцветные, а эшерихии — кирпично-красного цвета.

Среда Кесслера: к 1000 мл дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании 20–30 мин; фильтруют через вату; добавляют 2,5 г лактозы; доводят объем дистиллированной воды до 1000 мл; устанавливают рН 7,4–7,6; добавляют 2 мл 1% -ного водного раствора генцианвиолета; разливают в пробирки с поплавками по 8–10 мл и стерилизуют при температуре 121°C в течение 10 мин. Желчь и генцианвиолет являются ингибиторами грамположительных бактерий и, подавляя их размножение, облегчают индикацию кишечной палочки. Готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет и не меняет его во время роста бактерий. О наличии кишечной палочки в исследуемом продукте свидетельствует помутнение среды и появление газа в поплавках.

ХБ (хинозолбромкрезолпурпурная среда): в 1 л воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия, 5 г маннита. Приготовленную смесь кипятят 15–20 мин; устанавливают рН 7,4–7,6; фильтруют через бумажный фильтр; фильтрат кипятят 10 мин; охлаждают до 60°C; после чего прибавляют 30 мл дрожжевого диализата, 15 мл желчи, 10 мл раствора хинозола и 10 мл 1,6% -ного спиртового раствора бромкрезола пурпурного. Среду разливают в стерильные пробирки по 7–8 мл. При росте БГКП эта среда окрашивается в желтый цвет.

Среда Хейфеца выпускается в сухом виде. В состав, кроме основных питательных компонентов (вода, пептон, маннит, натрия хлорид), входят розоловая кислота, раствор метиленового синего. Готовая среда приобретает красно-фиолетовый цвет, при росте кишечной палочки рН сдвигается в кислую сторону, и среда приобретает зеленоватую окраску.

К средам для индикации сальмонелл относят висмут-сульфитный агар, среду Клиглера, трехсахарный агар, среды Кауфмана и Мюллера.

Висмут-сульфитный агар, или среда Вильсона — Блера. На данной среде сальмонеллы образуют характерные влажно-слизистые колонии черного цвета, у протей они зеленые, эшерихии на этой среде не растут или образуют единичные коричневые колонии с большим опозданием.

Среда Клиглера готовится из сухой питательной среды.

Трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому: к 100 мл 1,5% -ного МПА, рН 7,2, добавляют по 1 г лактозы и сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1,0 г мочевины, 0,02 г соли Мора ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,03 г натрия тиосульфата, 0,4 мл 0,4% -ного водного раствора фенолового красного (фенолрота).

Все ингредиенты, кроме фенолрота, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды (10 мл) на водяной бане. Затем вливают в расплавленный агар; фильтруют; рН доводят до 7,2–7,4.

После этого добавляют фенолрот и разливают в пробирки по 5–6 мл. Стерилизуют осторожно в прогретом автоклаве при температуре 112°C (не выше) в течение 30 мин. Лучше стерилизовать текучим паром 20 мин 3 дня подряд. После стерилизации среду скашивают так, чтобы оставался столбик высотой 3–4 см. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

Покраснение скошенной части столбика указывает на образование кислоты в результате расщепления лактозы и сахарозы. Покраснение столбика среды свидетельствует о расщеплении глюкозы. Эта среда позволяет выявлять расщепление мочевины, при этом происходит восстановление цвета до исходного.

Среда Кауфмана предназначена для культивирования сальмонелл, в ее состав включают раствор Люголя, тиосульфат натрия, раствор бриллиантового зеленого, бычьей желчи, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры.

Среда Мюллера содержит МПБ, мел, раствор Люголя, серноватистокислый натрий. Среду разливают по 8–10 мл в пробирки, перечисленные компоненты подавляют рост кишечной палочки и способствуют росту тифопаратифозных бактерий.

Среды для индикации золотистого стафилококка также относятся к селективным питательным средам.

Желточно-солевой агар применяют для выделения стафилококков из загрязненного посторонней микрофлорой материала. К МПА добавляют 10% хлорида натрия, а перед применением в расплавленный и охлажденный до 50°C агар добавляют 20% стерильной желточной взвеси. Патогенные стафилококки на этой среде вокруг колоний образуют «радужный венчик».

Солевой бульон: в 1000 мл РПБ, МПБ растворяют 65–90 г хлористого натрия; фильтруют; устанавливают рН 7,0–7,2; стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин.

Молочно-солевой агар: к 1000 мл расплавленного и охлажденного до 45–60°C РПА или МПА, содержащего 75 г хлорида натрия (рН 7,2–7,4), добавляют асептически 100 мл стерильного обезжиренного молока. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Агар типа Байрд-Паркер: в 1000 мл дистиллированной воды размешивают 30 г сухого питательного агара на основе ферментативного гидролизата кормовых дрожжей; добавляют 10 г пирувата натрия; 5 г хлористого лития. Нагревают при помешивании и кипятят в течение минуты до полного растворения ингредиентов. Устанавливают рН 7,2; стерилизуют при 121°C в течение 15 мин.

Перед применением в растопленную и охлажденную до 45–60°C среду асептически добавляют (из расчета на 100 мл среды) 0,5 мл 2%-ного раствора теллурита калия и 5 мл эмульсии яичного желтка.

К средам для выращивания клостридий относят среды Кита — Тароцци и Вильсона — Блера, сульфит-полимиксин-неомициновая среда, голодный агар.

Среда Кита — Тароцци: в пробирки с 2–3 кусочками вареной печени наливают высоким столбиком мясопептонный или печеночный бульон с 1% глюкозы. На поверхность среды в пробирки наслаивают 1–2 мл вазелинового масла. Стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин и pH 7,2 (необходимо проверить до и после стерилизации).

Среда Вильсона — Блера (железо-сульфитный агар) для индикации клостридий в исследуемом материале: к 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 80°C РПА или МПА, содержащего 1% глюкозы, добавляют 10 мл 20%-ного раствора сульфита натрия (Na_2SO_3) и 1 мл 5%-ного раствора железо-аммонийных квасцов ($\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (можно заменить 1 мл 8%-ного раствора железа сернистокислого (FeSI_4), pH среды 7,5–7,8).

Растворы солей готовят непосредственно перед применением и стерилизуют текучим паром в течение 1 ч. Клостридии на этой среде образуют характерные черные колонии.

Сульфит-полимиксин-неомициновая среда (СПН) для индикации клостридий в исследуемом материале. В 1000 мл печеночного бульона асептически вносят 5 мл 10%-ного водного раствора сульфита железа закисного (FeSO_4), 10 мл 10%-ного водного раствора сульфита натрия (Na_2SO_3), полимиксина М-200000 ЕД, сульфата неомицина В — 50 мг. Разливают в стерильные пробирки по 9 мл.

Голодный агар: 2 г агара расплавляют при нагревании в 98 мл дистиллированной воды. Стерилизуют при 121°C в течение 20 мин.

К средам для выращивания плесневых грибов относят агар Чапека, агар Сабуро, сусло-агар, среду Ван-Итерсона.

Агар Чапека рекомендуется применять для выращивания многих видов грибов. В состав среды входят: 1000 мл воды, 30 г глюкозы, 2 г нитрата натрия, 1 г дигидрофосфата калия, 0,5 г сульфата магния, 0,5 г хлорида калия, 0,0012 г сульфата железа и 20 г агара. Среду стерилизуют при давлении 0,5 атм. 30 мин.

Агар Сабуро применяют при выращивании возбудителей дерматомикозов и кандидамикозов. В состав среды входят:

1000 мл воды, 40 г глюкозы, 10 г пептона и 18 г агара. После стерилизации рН питательной среды должен быть в пределах 6,5.

Сусло-агар применяют при выращивании возбудителей дерматомикозов и кандидамикозов. Солодовое неохмеленное сусло разбавляют водой в соотношении 1:2, устанавливают рН 6,5–6,7, добавляют 2% агара, кипятят, фильтруют, стерилизуют при давлении 0,5 атм. 30 мин.

Среда Ван-Итерсона предназначена для выделения из кормов токсичных грибов, вызывающих стахиботриотоксикоз, дендродохиотоксикоз и др. К 1000 мл воды добавляют 0,5 г нитрат аммония и 0,5 г дигидрофосфат калия. Среду стерилизуют при давлении 1 атм. 30 мин. Полученной средой увлажняют фильтровальную бумагу в чашке Петри и делают посев изучаемых кормов.

План работы.

1. Ознакомиться с компонентами питательных сред, с рецептурой приготовления МПБ, МПА. Подготовить и взвесить по рецепту сухой агар-агар, пептон, поваренную соль; отмерить мясной экстракт мерными мензурками; соединить все компоненты в колбе и поставить в кипящую водяную баню.

2. Разлить приготовленный МПА в пробирки по 5 и 13 мл; закрыть пробками и подготовить для автоклавирования. Одну пробирку для проверки качества агар-агара скосить, охладить и убедиться в плотности среды.

3. Ознакомиться с фабричными питательными средами, приготовить из них агар Эндо, агар Левина, висмут-сульфитный агар, среду Вильсона — Блера по прописи указанной на этикетке, разлить в чашки Петри.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как готовят мясную воду?
2. Какие среды относятся к обычным, общеупотребительным? Каково их назначение?
3. Какие среды относятся к дифференциально-диагностическим? Каково их назначение?
4. Какие компоненты придают селективность селективным питательным средам?
5. С какой целью добавляют ингибиторы в питательные среды?
6. Почему посевы в МПЖ нельзя культивировать в термостате?

ТЕМА 8

Методы культивирования аэробных, микроаэрофильных и анаэробных бактерий

Цель занятия: ознакомиться с методами культивирования аэробных, микроаэрофильных и анаэробных микроорганизмов; изучить методы создания анаэробииза для культивирования анаэробных микроорганизмов.

Материальное обеспечение: набор пробирок с посевами микроаэрофильных, капнофильных бактерий — возбудителей *Bruccella*, *Campylobacter*; набор стерильных питательных сред для культивирования анаэробов и демонстрационных посевов анаэробов на следующих питательных средах: МППБ, мозговая среда и молоко высоким столбиком в пробирках со слоем вазелинового масла, сахарный агар в трубочках Вейона, кровяной агар в чашках Петри, среда Вильсона — Блера. Во всех перечисленных средах должен быть характерный рост микроорганизмов; анаэроостат, масляный вакуумный насос, эксикатор с притирающей крышкой.

Многие бактерии удовлетворяют свои энергетические потребности за счет дыхания, в процессе которого кислород выступает в качестве терминального акцептора электронов и протонов в дыхательной цепи. В соответствии с потребностями в молекулярном кислороде бактерии разделяют на пять основных групп.

1. *Облигатные (строгие) аэробы* способны получать энергию только путем дыхания и поэтому обязательно нуждаются в молекулярном кислороде.

2. *Облигатные (строгие) анаэробы*. К ним относятся бактерии, у которых энергетический и конструктивный метабо-

лизм происходит без кислорода. Рост строгих анаэробов может быть остановлен даже при незначительном содержании кислорода, поскольку у них отсутствуют ферменты (пероксидаза, каталаза и супероксид дисмутаза), расщепляющие токсические соединения кислорода.

3. *Факультативные анаэробы* растут как в присутствии, так и в отсутствии кислорода, так как они могут в зависимости от наличия или отсутствия кислорода осуществлять брожение или дыхание.

4. *Микроаэрофильные бактерии* хотя и нуждаются в кислороде для получения энергии, не могут размножаться без повышенного содержания CO_2 , поэтому они известны как *капнофильные* микроорганизмы (от греч. *karnos* — дым и *philos* — любовь). К микроаэрофилам относят большинство аэробных бактерий, например бактерии родов *Brucella*, *Campylobacter*, *Helicobacter* и *Neisseria*.

5. *Факультативные аэробы* способны культивироваться и в отсутствии кислорода. Бактерии могут существовать в среде, содержащей кислород, только при наличии толерантности к кислороду, которая связана со способностью бактериальных ферментов нейтрализовать токсичные соединения кислорода.

Методы культивирования аэробных, факультативно-анаэробных и микроаэрофильных бактерий.

При выращивании аэробных и факультативных анаэробов аэрация происходит в естественных условиях без применения каких-либо дополнительных приборов и приемов. В пробирки с посевами, закрытые ватными пробками, и в чашки Петри, прикрытые крышками, воздух хорошо проникает внутрь, что позволяет бактериям нормально развиваться.

Хотя микроаэрофильные бактерии по типу дыхания аэробы, они растут не в обычной атмосфере (21% кислорода), а с пониженным содержанием молекулярного кислорода. Например, *Campylobacter fetus* растет в атмосфере, содержащей 5–10% кислорода. Такую атмосферу можно создать в герметичных термостатах, анаэроостатах, заменяя часть воздуха сжатым оксидом углерода из баллона, или в обычном эксикаторе. В последнем случае пробирки с посевами помещают в герметичный эксикатор, в котором зажигают свечу или комочек ваты, смоченный

спиртом. Пламя затухает по мере выгорания кислорода, и снижения его концентрации достаточно для роста микроаэрофилов.

Для культивирования *Campylobacter fetus* чаще используют полужидкий 0,2–0,4% -ный мясopеченочный агар высоким столбиком благодаря особой консистенции. Конвекционные потоки не способны перемешивать верхние, богатые кислородом слои среды с нижними, что создает в среде, заполняющей пробирку, нужный градиент концентрации кислорода. Культуру микроаэрофилов вносят в пробирку с питательной средой уколом, в дальнейшем микроорганизм растет в зоне с оптимальным содержанием кислорода, обычно в виде серо-белого диска в верхнем слое питательной среды.

Возбудители бруцеллеза (*B. abortus*, *B. ovis*) относятся к микроаэрофилам и при первичном выделении из патматериала требуют повышенного содержания в атмосфере оксида углерода до 10–15%. Поэтому в боксах бруцеллезных лабораторий стоят аппараты Кипа, из которых подается оксид углерода в пробирки с посевами бруцелл. Посевы при этом закрывают не ватно-марлевыми, а плотнорезиновыми пробками.

Методы создания анаэробноза при культивировании строгих анаэробов.

Для культивирования строгих анаэробных микроорганизмов необходимо отсутствие кислорода и низкая величина окислительно-восстановительного потенциала (Eh, ОкВП). Строгие анаэробы погибают при наличии незначительных концентраций кислорода, умеренные менее чувствительны, а факультативные анаэробы могут расти в условиях обычной атмосферы (например, молочнокислые).

Для создания анаэробных условий применяют особые методы, обеспечивающие снижение парциального давления кислорода в питательной среде или окружающем пространстве, а также поддерживают полную герметизацию посевов от проникновения воздуха из окружающей среды. В некоторых случаях анаэроостат заполняют газовой смесью, состоящей на 80–90% из азота и на 10–20% из CO₂, до давления около 500 мм ртутного столба, что исключает диффузию воздуха вовнутрь.

1. *Физические методы* создания анаэробноза основаны на том, что из замкнутого пространства (анаэроостат или эксика-

тор), в которое поместили посевы с анаэробами, выкачивают воздух при помощи масляного вакуумного насоса. При помощи этих насосов можно достигнуть вакуума до 3–4 мм ртутного столба. Степень разрежения воздуха в анаэроостате показывает ртутный манометр, укрепленный на крышке анаэроостата. После выкачивания воздуха кран закрывают, а прибор ставят в термостат при 37°C.

2. *Химические методы* создания анаэробноза основаны на том, что кислород, находящийся в эксикаторе или анаэроостате, связывают химическими препаратами. Например, на дно эксикатора или анаэроостата помещают порошок пирогаллола и 10%-ный раствор едкого натрия (калия), при взаимодействии которых связывается весь кислород из замкнутого пространства.

3. *Биологический метод* создания анаэробноза возможен при совместном выращивании аэробных и анаэробных микроорганизмов. Например, в центре чашки Петри с сахарным кровяным агаром удаляют полосу среды, далее на одну половину чашки делают посев аэробных бактерий (*Serratia marcescens*, *Bac. subtilis*), а на другую половину — изучаемых анаэробов, затем края чашки герметизируют лейкопластырем. Этот метод можно применять только для нестрогих анаэробных бактерий.

4. *Комбинированный метод* заключается в том, что для большей надежности созданного анаэробноза применяют одновременно два метода. Например, вначале выкачивают воздух при помощи насоса, а остаток кислорода связывают химическим методом или культивированием в замкнутом пространстве аэробных бактерий, поглощающих оставшийся кислород.

При культивировании анаэробов следует придерживаться следующих правил:

1) для выращивания анаэробов применяют только органические специальные питательные среды, в состав которых входят глюкоза и кусочки печени, мяса;

2) все жидкие питательные среды разливают высоким столбиком, а для изоляции от кислорода воздуха на их поверхность настилают 2 мл вазелинового масла;

3) жидкие питательные среды перед посевом следует регенерировать в кипящей водяной бане в течение 20 мин для удаления воздуха;

4) исследуемый материал перед посевом следует прогревать в водяной бане в течение 20 мин при 80°C для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры.

К особенностям посева анаэробных микроорганизмов относится то, что исследуемый материал в питательные среды вносят в больших дозах, поэтому инструментом для посева анаэробов служат не бактериологические петли, а пастеровские пипетки.

Питательные среды, применяемые для культивирования анаэробов, делят на:

- 1) *накопительные* — для первичного посева;
- 2) *дифференциальные*, позволяющие дифференцировать один вид анаэробных микроорганизмов от другого.

К накопительным средам относится мясопептонный печеночный бульон (МППБ) или среда Китта — Тароцци. В результате размножения анаэробов на этой среде уже в первые сутки появляется помутнение, у некоторых — газообразование, а иногда и специфический запах.

На плотных дифференциальных средах анаэробы образуют поверхностные и глубинные колонии, характерные для каждого вида, что позволяет дифференцировать их друг от друга по культуральным признакам, а на некоторых дифференциальных средах одновременно изучают и ферментативные свойства. Методические приемы позволяют выращивать строгие анаэробы без использования анаэростата.

К дифференциальным средам относятся сахарный агар, глюкозо-кровоая агар, среда Вильсона — Блера, мозговая среда, молоко.

Сахарный агар перед посевом расплавляют, добавляют исследуемый материал, перемешивают и всасывают в тонкие трубки Вейона длиной до 20–25 см, диаметром — около 1 см. Один конец трубки запаивают, другой закрывают ватой и помещают в обычный термостат на сутки. На этой среде изучают газообразование (разрыв агара) и форму изолированных глубинных колоний, которые просматриваются при помощи лупы в глубине агара. Для некоторых анаэробов характерно образование колоний в виде двояковыпуклой линзы (диска), колоний с тонкими отростками, в виде комочка ваты и т. д.

На *глюкозо-кровоом агаре* можно одновременно изучить форму колоний на поверхности питательной среды и гемолити-

ческие свойства выделенного возбудителя. Чашки Петри с посевами анаэробов на поверхности питательной среды при культивировании обязательно ставят в анаэростат или термоанаэростат.

В среде Вильсона — Блера или железо-сульфитном агаре (ЖСА) анаэробные бактерии восстанавливают сульфит натрия до сульфата натрия, который, вступая в реакцию с хлоридом железа, образует черный осадок сульфита железа, окрашивающий изолированные колонии в черный цвет, — это дифференциальный признак.

В подготовленную чашку Петри наливают исследуемый материал, заранее распределенный в расплавленном ЖСА. Для создания строгих анаэробных условий застывший агар с посевом заливают слоем голодного агара. Большинство анаэробов образуют колонии в течение 20–24 ч, а для *Cl. perfringens* характерно появление черных колоний уже через 6–8 ч после посева.

Мозговая среда готовится из свежего мозга крупного рогатого скота: в две части фарша из мозга и одной части воды, добавляют сульфит натрия с хлоридом железа, как в ЖСА. Смесь раскладывают высоким столбиком в пробирки, поверхность заливают 2 мл вазелинового масла, автоклавируют при 110°C в течение 2 ч. Дифференциальным признаком при росте анаэробов на этой среде является ее почернение.

Молоко. К обезжиренному молоку добавляют кусочки печени, сыворотку крови, разливают высоким столбиком, наслаивают 2 мл вазелинового масла и дробно стерилизуют. Дифференциальным признаком является скорость свертывания молока, характер створаживания и пептонизация его.

План работы.

1. Ознакомиться с правилами работы с масляным вакуумным насосом при создании вакуума в анаэростате, а также методом создания анаэробных условий в эксикаторе.

2. Ознакомиться с набором питательных сред для культивирования анаэробов и методами культивирования их в эксикаторе и анаэростате, а также с особенностями техники посева анаэробных микроорганизмов в специальные питательные среды.

3. Ознакомиться с культуральными свойствами анаэробов на демонстрационных посевах анаэробов в питательные среды.

Изучить признаки роста анаэробов, являющихся дифференциальными для анаэробных микроорганизмов.

4. Ознакомиться с культуральными свойствами микроаэрофильных, капнофильных бактерий — возбудителей *Brucella*, *Campylobacter* на демонстрационных посевах, разлитых высоким столбиком в питательные среды. Найти и изучить признаки их роста, являющиеся дифференциальными.

5. Провести микроскопию готовых препаратов и ознакомиться с морфологией микроаэрофильных, капнофильных, анаэробных микроорганизмов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите методы создания анаэробноза и дайте краткую характеристику каждому из них.
2. Перечислите требования, предъявляемые к питательным средам для культивирования анаэробов.
3. Методические особенности посева анаэробных микроорганизмов.
4. С какой целью делают посев анаэробов на поверхность кровяного агара?
5. Какие культуральные особенности роста у микроаэрофильных, капнофильных бактерий?

ТЕМА 9

Техника посевов и пересевов. Методы выделения чистых культур бактерий

Цель занятия: овладеть техникой посева бактерий на плотные и жидкие питательные среды; освоить методы выделения чистых культур микроорганизмов.

Материальное обеспечение: пробирки со смесью двух культур *S. aureus* и *E. coli* в физрастворе; чашки Петри с МПА для выделения чистой культуры *S. aureus* методом Дригальского; чашки Петри с агаром Эндо для выделения чистой культуры *E. coli* методом Дригальского; пустые пробирки для имитации посева над пламенем спиртовки; бактериологические петли; спиртовки; микроскопы; набор красок для окраски по Граму; предметные стекла; иммерсионное масло.

Техника посева бактерий на питательные среды.

Все микробиологические исследования проводят в специальных помещениях — боксах. Посевы и пересевы проводят над пламенем спиртовки, инструментами для посева служат бактериологические петли, иглы и пастеровские пипетки.

При посеве бактерий на питательные среды или пересеве из одной пробирки в другую применяют следующую методику: пробирку с чистой культурой и пробирку со скошенным МПА берут в левую руку так, чтобы пробирка с чистой культурой была первой по отношению к работающему. В правой руке находятся бактериологическая петля, которую держат как карандаш, и две пробки от открытых пробирок, зажатые мизинцем и безымянным пальцем. Обжигают края открытых пробирок и вводят прокаленную петлю в пробирку с культурой. Петлю охлаждают о внутреннюю

стенку пробирки или прикасаются к участку незаeseянного агара и, если он не плавится, захватывают петлей часть бактериальной культуры. Быстро и осторожно вносят петлю с культурой в пробирку со стерильной средой, опускают до дна косяка (где конденсат) и зигзагообразным движением петли распределяют материал вверх по скошенной поверхности агара. После посева петлю извлекают, обжигают края пробирок и последовательно закрывают их слегка обожженными пробками, выводя пробирки из пламени по направлению к себе, затем прокалывают петлю.

Для посева в жидкие питательные среды применяют методику, описанную выше, только петлей в глубине среды делают несколько вращательных движений.

Посев на плотные среды в чашках Петри проводят также бактериологической петлей или стеклянным шпателем. Для этого крышку чашки Петри чуть приподнимают левой рукой, вводят под крышку бактериологическую петлю с посевным материалом и распределяют по поверхности среды различными методами в зависимости от конечной цели: «штрихом» до истощения посевного материала для получения изолированных колоний или делают сплошной посев «газоном».

Для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях применяют термостат, в котором круглосуточно автоматически поддерживается постоянная температура.

Термостат представляет собой двустенный шкаф с сетчатыми полками внутри и дверью, сделанными из теплоизолирующих материалов. Источником нагрева в термостате являются электронагревательные элементы, которые прогревают воду или воздух. Температура автоматически поддерживается на заданном уровне, для большинства патогенных микроорганизмов в пределах 37°C, для мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) — в пределах 30°C, так как эта температура является для них оптимальной. В термостат помещают штативы с пробирками, колбы и чашки Петри с посевами изучаемых микроорганизмов.

Для успешного культивирования бактерий необходимо применять свежие питательные среды. Особенно это касается плотных питательных сред, которые разливают в чашки Петри или скашивают в пробирках обязательно в день посева, чтобы были видны капельки свежего конденсата.

Сроки культивирования большинства патогенных, условно-патогенных микроорганизмов составляют 24–48 ч, некоторые бактерии растут медленно, например, возбудитель туберкулеза до 10–14 дней и больше.

Для полного понимания *бактериологических методов* необходимо знать специальные термины, применяемые в лабораторной практике.

Посев — первичное внесение исследуемого материала в питательные среды, цель посева — выделение и накопление возбудителя для дальнейшего изучения. *Пересев* — перенос выросшей бактериальной культуры в новую питательную среду. *Бактериальной культурой* называют микроорганизмы, выросшие на искусственных питательных средах. Различают *чистую бактериальную культуру*, в которой все бактерии относятся к одному виду, и *загрязненную*, если в ней присутствуют неизвестные бактерии. Любое бактериологическое исследование начинают с выделения чистой культуры, так как только в чистой культуре можно определить вид возбудителя.

Перед началом работы пробирки с 5 мл МПА расплавляют в кипящей водяной бане, пробирку с горячим жидким агаром фиксируют в наклонном положении, чтобы получить скошенную поверхность, удобную для посева. Для этого конец пробирки с пробкой приподнимают и кладут на пластинку высотой 1–1,5 см, в результате на дне пробирки должен получиться столбик МПА высотой 3 см, переходящий в косяк. Пробирку с 13–15 мл МПА также расплавляют и выливают в стерильную чашку Петри, закрывают крышку, чашку ставят на ровную поверхность, и после охлаждения получается плотная пластинка среды, готовая для посева.

При посеве необходимо соблюдать следующие правила: работа должна проводиться в боксе, над пламенем спиртовки, петлей нельзя касаться посторонних предметов, а ватные пробки — класть на стол. Начинающим бактериологам нужно предварительно приобрести навыки работы с пустыми пробирками, одновременно держа в левой руке три пробирки, а в правой — бактериологическую петлю и три пробки, имитируя процесс посева над пламенем спиртовки, открывая и закрывая пробирки, манипулируя бактериологической петлей.

Методы выделения чистых культур бактерий.

Обычно исследуемый материал, содержащий возбудителя инфекционной болезни или возбудителя пищевых токсикоинфекций, загрязнен сопутствующей микрофлорой, поэтому выделение чистой культуры из исследуемого материала является основной задачей при проведении бактериологического исследования.

Морфологические, культуральные и ферментативные особенности микроорганизмов, необходимые для определения вида микроорганизма, изучают, применяя только *чистые культуры бактерий*.

В лабораторной практике применяются механические и биологические методы выделения чистой культуры.

I. Механические методы выделения чистых культур основаны на механическом разъединении бактерий друг от друга. В истории микробиологии известны методы Пастера, Коха, но в лабораторной практике чаще применяют метод Дригальского. Суть метода заключается в том, что бактериологической петлей каплю исследуемого материала (кровь, гной и т. д.) наносят на поверхность плотной среды в чашке Петри и распределяют методом штриха так, чтобы механически разъединить бактерии, каждая из которых должна образовать изолированную колонию.

Бактерии, оставшиеся на поверхности питательной среды, размножаются поперечным делением со скоростью 20–30 мин, поэтому за сутки образуют видимую колонию. При этом надо учитывать, что одна бактерия образует одну колонию, поэтому все бактерии в этой колонии будут принадлежать одному виду. После посева чашку маркируют, ставят в термостат вверх дном, чтобы конденсат не размыл посевы, при 30°C или 37°C на 24 ч. Появившиеся колонии изучают с помощью лупы, нужную колонию обводят восковым карандашом со стороны дна чашки, готовят из нее мазок и окрашивают по Граму. Далее, чтобы получить чистую культуру, из выбранной колонии бактериологической петлей делают пересев на МПА и МПБ в пробирках, посевы культивируют в термостате. На следующий день из выросшей культуры делают препарат для микроскопии и, убедившись в том, что выделенная бактериальная культура морфологически однородная, приступают к изучению ее морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных свойств для идентификации, или определения вида.

II. Биологические методы выделения чистых культур основаны на учете биологических особенностей бактерий, таких как устойчивость к высокой температуре и кислоте, подвижность, а также их патогенность.

1. При применении высокой температуры для выделения чистой культуры *термоустойчивых* микроорганизмов исследуемый материал прогревают 10–20 мин при 80°C в расчете на то, что менее стойкие вегетативные формы погибнут при этой температуре, а споры останутся жизнеспособными. Из прогретого материала делают первичный посев в питательные среды методом Дригальского, далее из изолированных колоний термоустойчивых микроорганизмов делают пересев в пробирки с МПА и МПБ и получают чистую культуру спорообразующего возбудителя.

2. Для выделения чистой культуры *кислотоустойчивых* возбудителей туберкулеза патологический материал обрабатывают 5–10% -ным раствором серной кислоты в течение 10–15 мин. Благодаря действию кислоты погибает сопутствующая микрофлора, а возбудитель туберкулеза остается жизнеспособным. После нейтрализации раствора кислоты 1% -ным раствором гидроксида натрия исследуемый материал вносят на специальные питательные среды, на которых растут возбудители туберкулеза.

3. Для выделения чистой культуры *патогенных* микроорганизмов, находящихся в загрязненном исследуемом материале, проводят заражение молодых восприимчивых лабораторных животных (кролики, морские свинки, белые мыши). Организм животного здесь играет роль «биологического фильтра», через ткани которого проходят патогенные микроорганизмы, вызывающие гибель животного. После заражения и гибели животных трупы вскрывают и из всех внутренних органов делают препараты на предметном стекле, а также посевы на питательные среды. Полученную чистую культуру изучают и определяют вид возбудителя.

4. Выделение *подвижных* микроорганизмов методом Щукевича. С поверхности исследуемого материала (мясо, колбаса), петлей делается соскоб, который вносят в конденсат скошенного МПА, пробирку ставят в термостат при 37°C на 24 ч. Если в исследуемом материале были подвижные палочки *Proteus vulgaris*,

они дают характерный ползучий рост вверх по скошенному агару, из появившихся колоний делают посев на питательные среды, получают чистую культуру и определяют ее вид. Наличие *P. vulgaris* в исследуемом материале свидетельствует об антисанитарных условиях хранения продуктов питания.

План работы.

1. Приготовить препараты из смеси двух бактериальных культур — *S. aureus* и *E. coli*, окрасить по Граму, провести микроскопию и убедиться в наличии смешанной культуры.

2. Провести имитацию посева бактериологической петлей в пустые пробирки над пламенем спиртовки, научиться держать три пробирки в левой руке, бактериологическую петлю и пробки — в правой руке. Научиться открывать и закрывать пробки над пламенем спиртовки.

3. Далее работают две бригады: одна с МПА, другая с агаром Эндо.

3.1. Провести посев смеси двух культур методом Дригальского на поверхность МПА в чашках Петри для получения изолированных колоний и выделения чистой культуры *S. aureus*, образующей колонии желтого цвета.

3.2. Провести посев смеси двух культур на поверхность агара Эндо для получения изолированных колоний и выделения чистой культуры *E. coli*, которая образует красные колонии с металлическим блеском.

4. Овладеть методикой посева исследуемого материала в конденсационную воду скошенного МПА с целью получения чистой культуры *P. vulgaris*.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью выделяют чистую культуру микроорганизмов?
2. Перечислите методы выделения чистых культур бактерий.
3. На чем основаны механические методы выделения чистых культур?
4. На чем основаны биологические методы выделения чистых культур, такие как заражение лабораторных животных?
5. На чем основан метод получения чистой культуры спорообразующих бактерий и вульгарного протей?

ТЕМА 10

Культуральные свойства микроорганизмов

Цель занятия: ознакомить студентов с методами изучения культуральных свойств бактерий на плотных и жидких питательных средах.

Материальное обеспечение: набор демонстрационных посевов на МПА и МПБ с различными культуральными признаками; для студентов пробирки со скошенным МПА и МПБ для индивидуального пересева изолированных колоний *S. aureus* и *E. coli*, выросших на чашках Петри (с прошлого занятия); МПА в трех чашках Петри, расчерченных на сектора для посева-отпечатка поверхности пальца каждого студента; микроскопы, бактериологические петли, спиртовки, набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, иммерсионное масло; таблица «Культуральные свойства бактерий на плотных и жидких питательных средах».

Культуральные свойства микроорганизмов — это характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах, изучают для определения вида микроорганизмов.

Культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.

В благоприятных условиях в результате размножения одной микробной клетки на поверхности питательной среды образуются скопления микробной массы — колонии. Разные микроорганизмы в зависимости от вида образуют различные колонии, поверхностные и глубинные. Чаще культуральные

свойства изучают у суточной культуры, но некоторые виды бактерий образуют видимые колонии только через 10–14 дней. Колонии изучают визуально или при помощи лупы в проходящем и падающем свете, при этом учитывают следующие культуральные признаки:

- величину колоний (различают мелкие, точечные — 1 мм, средние — 2–4 мм и крупные — более 5–6 мм в диаметре, при этом быстро растущие колонии образуют крупные колонии, а медленно — мелкие);
- форма колоний (круглые, правильной формы, в научной литературе их называют S-формы; колонии неправильной формы, амёбовидные, корневидные, розеткообразные — R-формы);
- край колоний (гладкий, волнистый, бахромчатый, складчатый, изрезанный, зубчатый, в виде лопастей и т. д.);
- профиль колоний — плоские, выпуклые, куполообразной формы, конусообразные (в разрезе имеют форму треугольника), колонии со вдавленным центром;
- поверхность (гладкая, блестящая, морщинистая, радиально изрезанная, кратерная);
- степень прозрачности (росинчатые, прозрачные, мутные);
- наличие пигмента проявляется особенно интенсивно при солнечном освещении (желтые, красные, белые, прозрачные, в большинстве своем бесцветные, которые чаще обозначают как серо-белые);
- консистенция колоний определяется прикосновением бактериологической петли; она может быть слизистая, тягучая, зернистая, плотная и вросшая в агар; сухая и кожистая — характерна для бактерий, образующих споры;
- форму изолированных анаэробных колоний изучают в глубине агара; они могут быть в виде диска, комочка ваты, снежинки и т. д.

Колонии некоторых видов микроорганизмов издают характерный специфический запах (например, вульгарный протей, возбудитель столбняка), колонии других видов врастают в толщу питательной среды и иногда окрашивают его.

Культуральные свойства бактерий в некоторой степени зависят и от их подвижности. Так, *P. vulgaris* образует ползущие по всей поверхности кружевные колонии, наблюдается так на-

зываемый «феномен роения», а его неподвижный вариант образует небольшие четко оформленные колонии.

Культуральные свойства бактерий в жидких питательных средах.

Стерильный МПБ прозрачный, а после посева и размножения микроорганизмов бульон изменяется, появляются следующие признаки:

- помутнение (умеренное, обильное или в виде нежной опалесценции);
- поверхностный рост характерен для аэробов, иногда он может быть по краю мениска в виде пристеночного кольца, которое выражено слабо или интенсивно, бывает прочным или легко смываемым при встряхивании пробирки; в некоторых случаях бульон остается прозрачным, а на внутренней стенке пробирки появляются зерна, хлопья и даже структуры в виде сталактитов;
- поверхностный рост бактерий в бульоне может проявиться появлением пленки различной толщины и консистенции, например у возбудителей туберкулеза, в зависимости от вида бывает нежная пленка, сухая морщинистая пленка, мощная слизистая пленка, а некоторые бактерии образуют кожистую пленку;
- наличие осадка (незначительное, среднее, большое количество);
- характер осадка на дне пробирки изучают при легком встряхивании в проходящем свете; он может быть хлопьевидный или слизистый, который при встряхивании поднимается в виде слизистой косички или разбивается в равномерную муть, при этом крошковидный осадок чаще характерен для бактерий, образующих цепочки;
- некоторые бактерии образуют пигмент, который окрашивает питательную среду в желтый, сине-зеленый или красный цвет, в зависимости от вида бактерий.

План работы.

1. Изучить культуральные свойства бактерий, выросших на МПА после посева методом Дригальского. Обратит внимание на изолированные колонии, имеющие S- и R-формы.

2. Изучить культуральные свойства колоний золотистого стафилококка. Приготовить из них препараты, окрасить по Граму, определить тинкториальные свойства золотистого стафилококка, убедиться в однородности культуры.

3. Изучить культуральные свойства бактерий, выросших на агаре Эндо. Обратит внимание на красные колонии с металлическим блеском. Приготовить из них препараты, окрасить по Граму, определить тинкториальные свойства кишечной палочки, убедиться в однородности культуры.

4. Расчертить чашку Петри с МПА на сектора с номерами, в каждом секторе студент должен сделать посев-отпечаток поверхности пальца (осторожно, чтобы не раздавить агар), чашки поставить в термостат.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью изучают культуральные свойства микроорганизмов?
2. Опишите культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.
3. Опишите культуральные свойства бактерий на жидких питательных средах.
4. Назовите комплекс признаков, по которым определяют вид бактерий.

ТЕМА 11

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Цель занятия: освоить методы изучения ферментативных (биохимических) свойств микроорганизмов, таких как сахаролитические, протеолитические, гемолитические; научиться дифференцировать бактерии по ферментативным свойствам.

Материальное обеспечение: набор сред Гисса (или короткий пестрый ряд) с демонстрационными посевами *Salmonella*, *E. coli*; агар Эндо с посевом кишечной палочки и сальмонеллы, колонии которых наглядно, в виде слов *E. coli* и *Salmonella*, написаны бактериологической петлей, содержащей соответствующую культуру; чашки Петри от прошлого занятия с посевами отпечатков пальцев рук студентов; бактериологические петли; спиртовки; набор красок для окраски по Граму; предметные стекла; иммерсионное масло; микроскопы; таблицы: «Биохимическая дифференциация бактерий семейства *Enterobacteriaceae*», «Среды Гисса (короткий и длинный пестрый ряд)».

К настоящему моменту студенты знакомы с морфологическими, тинкториальными, культуральными признаками бактерий, при помощи которых можно провести идентификацию. Однако мир микроорганизмов так сложен, что различные виды микроорганизмов могут обладать одинаковыми перечисленными признаками, и только по набору ферментов их можно дифференцировать друг от друга.

Ферментативные свойства — это способность бактерий при помощи различных ферментов расщеплять сложные органические соединения. Каждый вид микроорганизмов синтезирует

определенный набор ферментов, эта способность генетически закреплена, поэтому по наличию или отсутствию фермента можно провести идентификацию микроорганизмов. Для изучения ферментативных свойств микроорганизмов готовят питательные среды строго определенного состава, в которые вносят изучаемую культуру микроорганизмов и наблюдают за появляющимися изменениями.

В лабораторной практике при идентификации чаще применяют изучение сахаролитических, протеолитических и регенерирующих свойств микроорганизмов.

Сахаролитические свойства бактерий изучают на жидких, полужидких (среды Гисса) и плотных питательных средах (среды Эндо, Левина, Плоскирева). Наличие синтезируемого фермента определяется по:

- изменению физического состояния питательной среды (наличие пузырьков газа в поплавках или в полужидкой среде, свертывание молока);
- изменению pH среды и цвета индикатора в дифференциально-диагностических средах (агаре Эндо, Левина, Плоскирева, среде Гисса с различными углеводами).

В бактериологической лаборатории в наличии всегда должны быть следующие индикаторы:

1) *индикатор Андрaде* готовят по следующей методике: 1 г кислого фуксина растворяют в 400 мл H_2O и 64 мл нормального раствора едкого натра, выдерживают сутки в термостате при $37^{\circ}C$. Хранят во флаконах из темного стекла. При приготовлении сред Гисса добавляют 1% индикатора. Данные среды при добавлении щелочи окрашиваются в желтый цвет; расщепление углевода до кислоты приводит к покраснению питательной среды;

2) *индикатор ВР* применяют при приготовлении сухих сред Гисса. В щелочной, т. е. в свежеприготовленной питательной среде, он имеет розовый цвет; при появлении кислых продуктов изменяет цвет от голубого до синего;

3) *тест с метиловым красным* показывает появление кислоты в среде после расщепления глюкозы. Исследуемую культуру выращивают 2–5 сут. в жидкой среде Кларка с глюкозой, в которую добавляют 5–6 капель раствора метилрота, который, как индикатор, проявляет себя в интервале pH от 4,4 до 6,0.

Положительным результатом является покраснение среды после внесения индикатора.

Для приготовления среды Кларка в 1000 мл дистиллированной воды добавляют 5 г пептона, 5 г гидрофосфата калия и 5 г глюкозы. Все компоненты растворяют в воде, кипятят 2–3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 6,9–7,0. Далее разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют при 112°C 20 мин.

Тест Фогеса — Проскауера выявляет промежуточный продукт расщепления глюкозы — ацетоин (ацетилметилкарбинол). Для проведения теста исследуемую культуру выращивают на среде Кларка. Затем к 1 мл культуры добавляют 0,6 мл 5% -ного раствора α -нафтола, перемешивают и вносят 0,2 мл 40% -ного раствора гидроксида калия и инкубируют 1 ч. Положительная реакция — окрашивание питательной среды в красный цвет, отрицательная реакция — желтое окрашивание.

Обычно ферментация углеводов происходит за 24–48 ч, но при использовании длинного пестрого ряда учет результатов проводят через 7–14 сут., так как некоторые углеводы расщепляются медленно. Бактерии, имеющие определенные ферменты, расщепляют углеводы и высшие спирты до альдегидов, кислот и даже до CO_2 , который улавливают в маленьких пробирках, перевернутых вверх дном (их называют поплавками), помещенных в обычные пробирки с жидкой средой, или образовавшиеся пузырьки газа фиксируются в толще полужидких сред Гисса.

При отсутствии ферментации углевода цвет среды не изменяется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым рядом».

На плотных дифференциально-диагностических средах, в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску. Например, *E. coli*, ферментирующая лактозу до молочной кислоты, изменяющая рН в кислую сторону, на агаре Эндо образует красные колонии, а *Salmonella*, не синтезирующая фермент, — бесцветные колонии.

Дифференциация основана на углеводе лактозы, для расщепления которой только у кишечной палочки есть необходимый

**Дифференциация бактерий кишечного-тифозного семейства
в средах Гисса (или короткий пестрый ряд)**

Виды бактерий	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Маннит
<i>E. coli</i>	КГ	КГ	—	КГ
<i>S. enteritidis</i>	КГ	—	—	КГ
<i>S. typhi</i>	К	—	—	К

КГ — кислота и газ; К — кислота; «—» — нет изменений.

фермент, поэтому в состав дифференциально-диагностических сред обязательно включают лактозу (табл. 4).

Способность *E. coli* расщеплять лактозу до кислоты и газа применяется на средах Эндо, Левина, Плоскирева, а также при санитарно-микробиологическом исследовании пищевых продуктов, смывов с поверхности производственного оборудования на среде Кесслера. Кроме этого, при анализе данных табл. 4 видно, что ферментативная активность представленных бактерий обратно пропорциональна их патогенности.

Протеолитические свойства бактерий изучают на средах, в состав которых входят белки — это молоко, МПЖ, МПБ. Протеолитические ферменты расщепляют белки до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Под действием протеолитических ферментов происходит глубокое расщепление казеина молока, пептонизация и просветление сгустка (известны бактерии из рода клостридий, вызывающих пептонизацию без свертывания); молочнокислые бактерии, ферментирующие молочный сахар (лактозу) до молочной кислоты, вызывают кислотное свертывание молока, что используется в молочной промышленности при получении кисломолочных продуктов, творога и сыра.

Тест на желатиназу: делают посев изучаемых бактерий уколом в глубину столбика МПЖ. Посевы оставляют при комнатной температуре и наблюдают 5–7 дней за появляющимися изменениями, при этом изучают не только разжижение среды, но и его особенности. Под действием желатиназы может происходить необратимое разжижение на поверхности в виде воронки, если это аэробные, и в глубине среды, если это анаэробные бактерии.

При глубоком расщеплении белка до конечных продуктов выделяются *индол*, *аммиак* и *сероводород*. Для выявления этих газов высоко над засеянной средой между стенкой пробирки и самой пробкой фиксируют полоску индикаторной бумаги, после ставят в термостате в течение 1–3 сут., максимум 6 сут.

Первый тест на индол: индикаторную полоску, пропитанную насыщенным раствором щавелевой кислоты, фиксируют над посевом в МПБ. При выделении индола, на 2–3-й день после посева, нижняя часть индикаторной бумаги приобретает розовый цвет.

Второй тест на индол: к культуре, выращенной в бульоне Хоттингера, добавляют 1–3 мл эфира, встряхивают, отстаивают и вносят 0,5 мл реактива Эрлиха (в 9 мл 96% -ного этанола добавляют 1 г парадиметиламино-бензальдегида и 20 мл соляной кислоты). Через 5 мин получают результат. При наличии индола на границе эфира и питательной среды появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Тест на аммиак: над посевом в МПБ фиксируют розовую лакмусовую полоску индикаторной бумаги, которая при выделении аммиака через 1–5 сут. синеет.

Тест на сероводород: над посевом фиксируют полоску бумаги, пропитанную 5% -ным раствором ацетата свинца. При взаимодействии сероводорода с уксуснокислым свинцом бумага чернеет за счет образования сульфида свинца.

Тест на каталазу, который образуют аэробные бактерии: бактериальную массу снимают с поверхности агара бактериологической петлей и суспендируют в капле 3% -ного раствора перекиси водорода. Если изучаемая культура выделяет каталазу, в капле появятся пузырьки.

Для проведения *теста на оксидазу* необходима индикаторная бумага, пропитанная 1% -ным раствором тетраметилпарафенилендиамина дигидрохлорида. Бактериальную массу изучаемой культуры петлей наносят на поверхность индикаторной бумаги, в положительном случае через 10–60 с появляется фиолетовое или пурпурное окрашивание.

Тест на редукцию нитратов выявляет восстановление нитратов до нитритов. Изучаемую культуру засевают в МПБ, содержащий 0,2% нитрата калия, культивируют 48–72 ч, затем в опытную и контрольную пробирки добавляют по 1 мл реактива с крахмалом (в 100 мл H_2O добавляют 1 г растворимого

крахмала и 0,5 г йодида калия, перед постановкой реакции к этому раствору добавляют несколько капель 10% -ного раствора соляной кислоты). В положительном случае среда окрашивается в темно-синий цвет.

Тест на общую фосфатазу: исследуемую культуру микроорганизмов засевают штрихом на поверхность МПА с натриевой солью дифосфата фенолфталеина и инкубируют 4–5 сут. Чашки переворачивают вниз крышкой, на внутреннюю поверхность которой наносят каплю 28–30% -ного раствора нашатырного спирта. При наличии фосфатазы колонии окрашиваются в красный цвет.

Тест на редуцирующую способность бактерий: готовят молоко с метиленовой синью (1000 мл молока подщелачивают добавлением 10% -ного раствора карбоната натрия до рН 7,2 и вносят 20 мл 1% -ного водного раствора метиленового синего), молоко приобретает голубой цвет, далее его разливают в пробирки по 7–8 мл и дробно стерилизуют. Изучаемую культуру вносят в такое молоко, сутки культивируют в термостате и учитывают результаты. Если культура обладает редуцирующими свойствами, метиленовая синь восстанавливается и молоко обесцвечивается.

В настоящее время биологическая промышленность выпускает *тест-системы для быстрой идентификации бактерий* по группе специально отобранных ферментативных признаков. Они представляют собой пластмассовые пластины с микропробирками, заполненными различными сухими средами, в которые вносят суспензию исследуемой культуры и после инкубирования в термостате учитывают результаты. К тест-системам прилагаются таблицы для учета результатов и идентификации микроорганизмов в зависимости от спектра выявленных ферментов.

Нижегородский институт микробиологии и эпидемиологии выпускает следующую тест-систему: биохимические пластины для идентификации энтеробактерий (ПБДЭ). Также разработаны тест-системы для санитарно-микробиологических целей.

За рубежом разработаны тест-системы для идентификации энтеробактерий, анаэробов, несбраживающих бактерий и т. д.

Таким образом, мы изучили морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства, освоили методические приемы, по которым можно провести идентификацию изучаемого микроорганизма.

План работы.

1. Освоить методы изучения ферментативных свойств *E. coli* и *Salmonella* на демонстрационных посевах на среды Гисса (короткий «пестрый ряд») и агаре Эндо. Определить вид «зашифрованного микроба», посеянного в пробирки короткого «пестрого ряда» по изменению цвета индикатора и наличию газа в поплавках, используя данные биохимической дифференциации.

2. На агаре Эндо провести дифференциацию колоний *E. coli* и *Salmonella* по их цвету. (Весьма наглядно получается, если слова *Escherichia* и *Salmonella* написать на поверхности агара бактериологической петлей, смоченной соответствующей культурой.)

3. Освоить методы изучения протеолитических свойств бактерий в пробирках с МПЖ и с молоком, а также методику определения выделения сероводорода, аммиака и индола изучаемыми микроорганизмами.

4. Ознакомиться с демонстрационными посевами: чашки Петри с кровяным агаром с зоной гемолиза вокруг колоний стафилококков и с положительной реакцией плазмокоагуляции.

5. Изучить результаты посева пальцев рук на МПА в чашке Петри; обратить внимание на количество колоний; приготовить из них препараты; окрасить по Граму; изучить под микроскопом; провести анализ.

6. Ознакомиться с тест-системами, выпускаемыми биологической промышленностью для быстрой идентификации бактерий по группе специально отобранных ферментативных признаков.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью изучают ферментативные свойства бактерий?
2. Какие ферментативные свойства изучают у бактерий?
3. Наличие какого углевода имеет дифференциально-диагностическое значение в среде Эндо?
4. До каких конечных продуктов происходит расщепление углеводов и белков?
5. С какой целью изучают способность бактерий вызывать гемолиз эритроцитов и коагулировать плазму крови кроликов?
6. Перечислите все изученные таксономические признаки.

ТЕМА 12

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятия: дать представление о сущности реакции преципитации, применении ее в ветеринарно-лабораторной практике, получении и подготовке компонентов; освоить методы постановки реакции; ознакомить с различными модификациями проведения реакции преципитации.

Материальное обеспечение: уленгутовские пробирки в штативах, пастеровские пипетки; диагностикумы: флакон с преципитирующей сибиреязвенной сывороткой с этикеткой; фабричная упаковка с ампулами сибиреязвенного антигена; две пробирки с экстрактом из кожевенного сырья — положительная и отрицательная пробы; демонстрация реакции диффузионной преципитации в агаровом геле микро- и макрометоды, чашки Петри; предметные стекла; соответствующие таблицы.

Серологическая (от *лат.* serum — сыворотка крови) диагностика основана на проведении различных серологических реакций. В основу практического применения этих реакций положен принцип тесной физико-химической связи между родственными антигеном и антителом. На основании данного принципа по одному известному компоненту можно сделать заключение о природе другого, т. е. природе неизвестного. Таким образом, во всех серологических реакциях участвуют два основных компонента — антиген и антитело, реакция между которыми осуществляется в электролитической среде. В качестве последней используют 0,85% -ный раствор поваренной соли (физиологический раствор).

Антигены — естественные или синтетические высокомолекулярные генетически чужеродные вещества, распознаваемые клетками организма и вызывающие иммунный ответ в виде образования антител (иммуноглобулинов Ig), появления сенсibilизированных лимфоцитов или развития толерантности к данному антигену.

Реакции «антиген — антитело», происходящие *in vivo*, — это важнейший защитный механизм устранения множества антигенов, с которыми организм может встретиться в любой момент.

К антигенам, имеющим значение в ветеринарной микробиологии, относят живые и убитые микроорганизмы, их структурные образования (корпускулярные антигены), продукты их жизнедеятельности — токсины, ферменты, продукты метаболизма (растворимые антигены).

Антигены для проявления своего действия должны быть:

- генетически чужеродными;
- высокомолекулярными соединениями. Это, прежде всего, белки (полноценные антигены) и полисахариды, липополисахариды и др. (неполноценные антигены — гаптены);
- парентерально введены (попасть) в организм, т. е. минуя желудочно-кишечный тракт.

Полноценные антигены способны в организме животного вызывать образование антител (Ig), а также вступать с ними в реакцию *in vitro*.

Антитела — специфические белки (иммуноглобулины Ig), способные распознавать антиген и реагировать с ним, лишая его вредного воздействия на организм животного. Они вырабатываются зрелыми плазматическими клетками (В-лимфоцитами) и поступают из лимфоидной системы в кровь.

Серологические реакции используют для:

1) серодиагностики — выявления в сыворотке крови больного животного специфических антител к тому или иному антигену, микроорганизму;

2) сероидентификации — определения вида микроорганизма или неизвестного антигена по известному антителу.

В зависимости от физико-химического состава антигена, функциональных групп антител, участвующих в серологических реакциях, происходит строго специфическое взаимодействие

антигена с антителами: преципитация, агглютинация, лизис клеток, связывание комплемента и др. Все это позволяет использовать визуально видимый феномен в практических целях. Биологическая промышленность выпускает диагностические препараты — антигенные и антительные диагностикумы определенной специфической направленности. Так, при помощи этих препаратов можно идентифицировать неизвестный микроорганизм, обнаружить в исследуемой сыворотке специфические антитела и, следовательно, поставить диагноз, т. е. провести серологическую диагностику.

Сущность реакции преципитации состоит в осаждении (преципитации) антигена, находящегося в высокодисперсном состоянии, под воздействием специфических антител находящихся в иммунной сыворотке. В результате положительной реакции антиген переходит в грубодисперсное состояние и образуется видимый невооруженным глазом комплекс «антиген + антитело» в виде серо-белого диска (*преципитат*).

Растворимый антиген, участвующий в реакции, называется *преципитиногеном*, а антитела — *преципитинами*.

Антитела, реагирующие с растворенным антигеном, обеспечивающие выпадение мелкодисперсионного осадка комплекса «антиген — антитело» в среде электролита, называются *преципитинами*.

Реакция является высокочувствительным тестом, с помощью которого можно выявить наличие специфического антигена в разведении 1:100 тыс. и более, т. е. в столь малых количествах, в которых он не обнаруживается химическим путем. Реакция преципитации применяется для диагностики инфекционных болезней, вызываемых как бактериями, так и вирусами.

В ветеринарии РП широко используют для исследования кожевенного и мехового сырья, шерсти, мяса, загнившего патологического материала на сибирскую язву. Это особенно важно, когда не представляется возможным выделение самого возбудителя.

Бактериальные антигены, используемые для реакции преципитации, обладают устойчивостью к высокой температуре. Так, сибиреязвенный, чумной, туляремийный и другие антигены не разрушаются при кипячении в течение 45 мин, они сохраняются в гниющих субстратах.

Реакция преципитации применяется также в судебной медицине и ветеринарии для определения видовой принадлежности белка крови и в ветеринарно-санитарной практике для выявления фальсификации мясных, рыбных продуктов. С помощью этой реакции можно определить, из какого мяса (свиного, говяжьего, конины и др.) приготовлен тот или иной продукт.

Для ее проведения разработаны методы кольцепреципитации, диффузной преципитации, диск-преципитации.

Реакция кольцепреципитации.

Эта реакция была разработана А. Асколи в 1910 г. для исследования кожевенного сырья на сибирскую язву. Она получила также и другое название — *асколизация* кожевенного сырья.

Для ее проведения необходим ряд компонентов.

1. Экстракт из исследуемого сырья: кусочки исследуемой кожи, нанизанные на проволоку в виде кольца, стерилизуют в автоклаве при давлении 1,5 атм. 30 мин (для исключения заражения персонала лаборатории). Данные пробы охлаждают, измельчают, помещают в баночки и заливают 0,3%-ным карбонизированным физиологическим раствором (на 1 г сырья — 9 мл). Продолжительность экстрагирования составляет 16–20 ч (холодный способ).

Пробы от свиных шкур и мяса экстрагируют горячим способом в водяной бане в течение 30 мин. Полученный материал фильтруют через асбестовую вату. Экстракт из исследуемого сырья должен быть прозрачным, поэтому даже при незначительном помутнении данную пробу необходимо перефильтровать. В экстракте, полученном из кожсырья больных животных, содержится сибирезывенный антиген в высокодисперсном состоянии.

2. Сибирезывенную преципитирующую сыворотку получают путем гипериммунизации лошадей на предприятиях биологической промышленности. Для этого лошадям-производителям внутривенно многократно (16–17 раз) вводят возбудитель сибирской язвы (антиген) с интервалом в 3–7 дней в нарастающих дозах — от 5 до 70 мл. Предварительно до гипериммунизации лошадей вакцинируют для создания грунд-иммунитета.

Через 10–14 дней после последнего введения антигена у лошадей берут кровь в количестве 5–6 л и отделяют преципитирующую гипериммунную сыворотку, содержащую противосибиреязвенные антитела. Полученную специфическую сыворотку консервируют 0,5% фенола и отстаивают в течение 2 мес., затем фильтруют через стерилизующие пластины и расфасовывают в стерильные флаконы (объем — 50 мл) с этикетками.

3. 0,85% -ный раствор поваренной соли (физраствор).

Для контроля используют следующие компоненты:

1) специфический сибиреязвенный антиген биофабричного изготовления, который представляет собой прозрачный обезвреженный экстракт, полученный из возбудителя сибирской язвы (в ампулах с этикеткой);

2) нормальная сыворотка в ампулах, фабричного изготовления, полученная от здоровых животных.

Методы постановки реакции преципитации.

1. *Метод наслаивания:* в уленгутовские пробирки наливают около 0,3 мл преципитирующей сыворотки (по стенке, чтобы остался мокрый след), затем осторожно по мокрому следу мелкими каплями наслаивают в таком же объеме исследуемый экстракт (антиген) так, чтобы получилась тонкая и четкая граница между двумя компонентами.

2. *Метод подслаивания:* в уленгутовские пробирки наливают около 0,3 мл исследуемого экстракта (антигена), затем под него подслаивают тонко оттянутой пастеровской пипеткой около 0,3 мл преципитирующей сыворотки.

Положительная РП характеризуется появлением в первые 1–2 мин (не позднее 10–15 мин) на границе двух компонентов тонкого серо-белого кольца — преципитата, состоящего из грубодисперсного комплекса «антиген + антитело».

При учете реакции штатив с пробирками держат на уровне глаз и просматривают на черном фоне в проходящем свете.

Любая серологическая реакция сопровождается контролем качества всех компонентов:

- преципитирующая сибиреязвенная сыворотка + физраствор — эталон отрицательной реакции;
- преципитирующая сибиреязвенная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных — отрицательная реакция;

- преципитирующая сибирезвенная сыворотка + специфический антиген — эталон положительной реакции;
- нормальная сыворотка + экстракт из исследуемой кожи — отрицательная реакция.

Реакция диск-преципитации.

Эта реакция используется при диагностике сибирской язвы и дифференциации ее возбудителя от подобных ему сапрофитных микробов рода *Bacillus*. Она основана на взаимодействии продуктов метаболизма нативных антигенов, растущих в жидкой питательной среде возбудителя сибирской язвы, с антителами преципитирующей сибирезвенной сыворотки в слое агарового геля. При этом происходит образование диска преципитации в слое агарового геля, расположенного между антигеном и сывороткой.

Для постановки реакции диск-преципитации необходимы следующие компоненты:

- 1) преципитирующая сибирезвенная сыворотка;
- 2) очищенный 1% -ный агаровый гель;
- 3) жидкая питательная среда для возбудителя сибирской язвы.

Техника проведения реакции диск-преципитации сводится к следующему: преципитирующую сибирезвенную сыворотку разливают по 1 мл в стерильные бактериологические пробирки. На поверхность сыворотки наслаивают расплавленный и охлажденный до 15°C 1% -ный агаровый гель столбиком высотой 5–7 мм. На поверхность застывшего агара вносят 1–1,5 мл МПБ, засеянного исследуемой культурой. Посевы выдерживают в термостате при 37°C в течение 16–20 ч. Учет результатов проводят визуально на темном фоне.

Если исследуемая культура является возбудителем сибирской язвы, то в средней части столбика агарового геля образуется белая линия преципитации в виде диска с четкими границами.

Почвенные сибирезвенные сапрофитные бациллы, за исключением нескольких штаммов *Bac. anthracoides*, дают отрицательный результат (диск преципитации отсутствует).

В качестве контроля при постановке реакции могут быть использованы посевы, сделанные из флакона с сибирезвенной вакциной СТИ.

Реакция диффузионной преципитации (РДП).

Эта реакция нашла широкое применение при диагностике инфекционных болезней, для обнаружения антител в исследуемой сыворотке крови и определения их титра, а также для установления токсигенности некоторых видов микроорганизмов и др.

Техника проведения этой реакции сводится к следующему: из агара фирмы «Дифко» готовится 1,5%-ный агар в физиологическом растворе (рН 7,2–7,4) с добавлением мертиолатата (1:10000) как консерванта. В стерильные чашки Петри разливают по 20–25 мл расплавленного агара слоем 3–6 мм. После застывания агара в его слое штампами с различным количеством пробойников вырезают лунки на расстоянии друг от друга 4–10 мм, в которые вносят по одной капле горячего агара для формирования дна лунки. Розлив компонентов реакции в лунки проводится различно в зависимости от методики и поставленных целей. Например, в центральную лунку (диаметр 16 мм) вносят иммунную сыворотку, в периферическую лунку (диаметр 12 мм), исследуемые антигены или наоборот. Чашки с поставленной реакцией выдерживают 24–72 ч при комнатной температуре.

За это время реагенты диффундируют в агар навстречу друг другу. При положительной реакции образуется комплекс $Ag + At$ в виде линии преципитации серо-белого цвета в месте встречи или в зоне эквивалентного соотношения антигенов и антител. При учете реакции обращают внимание на число линий преципитации, их расположение между лунками и относительно друг друга. Характер взаимного расположения линий преципитации зависит от состава анализируемых антигенов и сыворотки. Если линии преципитации сливаются, то анализируемые антигены идентичны, если пересекаются — неидентичны.

Эта реакция может быть осуществлена и микрометодом. В данном случае слой агара готовят на предметных стеклах, в котором делают лунки. В остальном эта реакция сходна с макрометодом.

План работы.

1. Ознакомиться с биопрепаратами для постановки РП.

2. Провести постановку и учет результатов реакции кольце-преципитации методами «наслаивания» и «подслаивания».

3. Ознакомиться с результатами готовой реакции диффузионной преципитации, поставленной для демонстрации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как называются компоненты в реакции преципитации?
2. Какова последовательность внесения компонентов при проведении РП методом наслаивания и подслаивания?
3. Какие изменения претерпевает высокодисперсный антиген под действием специфических антител в РП?
4. При постановке РП проведен контроль: в пробирки внесли преципитирующую сыворотку и специфический антиген. Каков будет результат в этом контроле?

ТЕМА 13

Реакция агглютинации: пробирочный метод. Другие модификации постановки реакции

Цель занятия: дать представление о сущности реакции агглютинации, применении ее в ветеринарно-лабораторной практике, получении и подготовке компонентов; освоить методы постановки РА объемным (пробирочным) и капельным методами; ознакомить с различными модификациями проведения РА.

Материальное обеспечение: пробирки в штативе, пипетки на 1 и 5 мл, физиологический раствор в колбах, бруцеллезная (позитивная) и нормальная (негативная) сыворотки, единый бруцеллезный антиген для РА и РСК; предметные стекла, пипетки, сальмонеллезный антиген-диагностикум биофабричного изготовления и специфические О- и Н-агглютинирующие сальмонеллезные сыворотки; для демонстрации: пробирки с положительной и отрицательной кольцевой реакцией с молоком на бруцеллез; плексигласовые панели с гемагглютинацией; роз-бенгал проба (РБП) на бруцеллез.

Агглютинацией называется склеивание микробных или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролитов. Двухфазный характер этого взаимодействия ничем не отличается от механизма других двухкомпонентных реакций иммунитета: первая фаза — специфическая, невидимая, когда происходит взаимодействие бактерий с антителами; вторая фаза — неспецифическая, в процессе которой изменяется физико-химическое состояние реакционной жидкости, образуются видимые хлопья агглю-

тината. Антиген, вступающий в реакцию, носит название *агглютиногена*, антитела сыворотки — *агглютинины*, а комплекс «антиген — антитело», выпадающий при положительной реакции, — *агглютинат*.

Реакция агглютинации используется для серологической диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бруцеллеза, сальмонеллеза, колибактериоза, сапа, листериоза, кампилобактериоза и др.

Она проводится с двумя целями:

1) для обнаружения специфических антител в исследуемых сыворотках;

2) для установления вида (серогруппы, сероварианта) выделенного возбудителя из патологического материала с помощью известных сывороток, содержащих специфические антитела.

Агглютинация происходит при температуре 37°C в растворе электролитов (0,8% -ный раствор хлорида натрия), в слабощелочной среде (рН 7,2–7,4).

По характеру агглютинации разделяют на два вида.

1. Соматическую агглютинацию, когда происходит склеивание и оседание неподвижных, не имеющих жгутиков, микробов. Эта форма О-агглютинации протекает медленно, в течение 18–24 ч, и дает плотный осадок, который при встряхивании разбивается на мелкие зерна.

2. Жгутиковую агглютинацию, когда происходит склеивание и оседание подвижных, имеющих жгутики микробов. Эта форма Н-агглютинации происходит значительно быстрее, уже через 2–4 ч, и дает рыхлый осадок, который при встряхивании легко разбивается на крупные хлопья.

Существует множество вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: классическая, развернутая реакция агглютинации, которая проводится в пробирках с различными разведениями сыворотки; на предметном стекле (капельная, пластинчатая: кровяно-капельная гемагглютинация); роз-бенгал проба (РБП), кольцевая проба (реакция) с молоком и др.

Для серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота в ветеринарной лабораторной практике применяется пробирочная РА, которую ставят в объеме 1 мл. Для

постановки РА с исследуемой сывороткой необходим ряд компонентов:

1. Исследуемая сыворотка крови. Кровь берут из яремной вены в пробирки с номером индивидуально у каждого животного. В лаборатории пробирки выдерживают для свертывания крови 45 мин при 30–37°C. Появившийся сгусток крови отделяют от стенок стальной спицей, а затем данные пробы помещают в холодильник при 4°C. Отстоявшуюся сыворотку отсасывают через 20–24 ч и переносят в сухие стерильные пробирки.

Исследуемые сыворотки для проведения РА, в зависимости от вида животного, разводят физиологическим раствором согласно наставлению.

2. Известный антиген представляет собой взвесь убитых бруцелл в физиологическом растворе в определенной концентрации (10 млрд/мл). Бруцеллезные антигены готовят и стандартизируют на биопредприятиях, разливают во флаконы с этикеткой.

3. 0,85% -ный раствор поваренной соли, pH 7,2–7,4 (физраствор).

Для контроля качества компонентов в поставленной РА используют:

1) позитивную (положительную) сыворотку в ампуле, полученную биопредприятием;

2) негативную (отрицательную) сыворотку крови здоровых животных в ампуле, полученную биопредприятием.

Для исследования каждой пробы сыворотки крови требуется пять пробирок, поставленных в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых животных. Розлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки. После приготовления основного разведения сывороток в остальные пробирки (кроме второй) каждого ряда разливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки с исходным разведением 1:25 переносят по 0,5 мл во вторую (пустую) и третью пробирки, получая разведение 1:25 и 1:50. Из третьей пробирки переносят 0,5 мл в четвертую, получая разведение 1:100, из нее в пятую по 0,5 мл, получая разведение 1:200. Из последней

Схема постановки пробирочной РА для серологической диагностики бруцеллеза (по Т. С. Костенко и др., 2001)

Компонент реакции	Количество компонентов в пробирке, (мл)					
	1 (исходное разведение)	2	3	4	5	6 (контроль антигена)
Физиологический раствор	2,4	—	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка крови	0,1	0,5 из первой пробирки	0,5 из первой пробирки	Последовательный перенос по 0,5 мл, начиная с третьей пробирки		—
Полученное разведение сыворотки	1:25	1:25	1:50	1:100	1:200*	—
Бруцеллезный антиген 10 ⁹ кл/мл	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Конечное разведение	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	—
	Перемешивают осторожным встряхиванием. Инкубирование при 37–38°C 18–20 ч					

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

пробирки (1:200) излишек жидкости — 0,5 мл — удаляют. Далее, добавив во все пробирки (кроме исходной) по 0,5 мл фабричного антигена, разведенного 1:10, получают ряд из четырех пробирок со следующим разведением исследуемых сывороток: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме по 1 мл.

Первая пробирка с исходным разведением сыворотки 1:25 остается без антигена и служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются.

В табл. 5 представлена схема постановки пробирочной РА для серологической диагностики бруцеллеза.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят три контроля:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех же разведениях, как и с исследуемыми;

- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации.

После розлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно встряхивают и помещают в термостат при 37–38°C на 16–20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах по следующей схеме;

- (++++) — полное просветление жидкости; на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100% -ная агглютинация);
- (+++) — неполное просветление жидкости; «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании появляются мелкие зерна (75% -ная агглютинация);
- (++) — незначительное просветление жидкости; «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании появляются мелкие зерна (50% -ная агглютинация);
- (+) — едва заметное просветление жидкости; «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество зерен (25% -ная агглютинация);
- (–) — просветление жидкости; образование «зонтика» не произошло, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++).

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сыворотками крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два плюса (++).

При получении сомнительных результатов сыворотки крови животных повторно исследуют через 3–4 нед. (Шумилов К. В. и др., 1993).

Капельный метод РА применяют в основном для идентификации культур бактерий, а также для установления их принадлежности к определенным серогруппам и серовариантам. Техника постановки РА сводится к следующему: на предметное стекло раздельно наносят 2 капли — каплю известной агглютинирующей диагностической сыворотки (из флакона с этикеткой) и каплю физиологического раствора (контроль). Бактериологической петлей снимают с агара часть изучаемой бактериальной культуры, петлю увлажняют в капле сыворотки, затем культуру рядом с каплей растирают до гомогенного состояния, смешивают с сывороткой и, слегка покачивая, осторожно подогревают в пламени спиртовки до 37°C (не более). Если сыворотка и бактериальная культура специфичны друг другу, агглютинация наступает в ближайшие 2–3 мин. Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальных клеток и полного (или частичного) просветления жидкости в капле.

В контрольной капле — физраствор + антиген — реакция агглютинации не происходит, капля остается равномерно мутной (здесь контролируют качество компонентов и возможность самоагглютинации).

Реакцию агглютинации учитывают при хорошем освещении, применение лупы облегчает учет реакции.

Реакция гемагглютинации (РГА).

Эта реакция не относится к реакциям иммунитета, так как является результатом действия естественных гемагглютининов некоторых бактерий и вирусов на эритроциты, что влечет за собой их агглютинацию.

Данную реакцию ставят на плексигласовых панелях с лунками. Готовят ряд разведений исследуемого материала в физрастворе и к ним добавляют равный объем 1–2% -ной взвеси эритроцитов, после чего панели с реакцией помещают в термостат на 30 мин или оставляют при комнатной температуре на 1 ч.

Учет реакции производят по характеру осадка. При положительной реакции осадок из склеившихся эритроцитов имеет форму раскрытого «зонтика» с изрезанными краями, а при отрицательной — осадок в виде диска (кнопки) с ровными краями.

Реакция гемагглютинации позволяет выявить только наличие и концентрацию бактерий (вирусов), обладающих гемагглютинирующей способностью. Для идентификации этих микроорганизмов в дальнейшем применяют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА).

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).

Реакция торможения гемагглютинации относится к иммунным реакциям, в которой специфические антитела, взаимодействуя с антигеном, лишают его способности агглютинировать эритроциты.

Реакция проводится в два этапа. На первом этапе готовят ряд разведений специфической сыворотки от 1:10 до 1:1280; к каждому разведению сыворотки добавляют равный объем жидкости, содержащий антиген в четырехкратном титре, который определен в предварительно поставленной РА. При этом, если произошла полная агглютинация эритроцитов антигеном в разведении 1:640, для дальнейшей работы применяют антиген в 4 раза концентрированнее, т. е. в разведении 1:160.

На втором этапе, после инкубирования при 37°C в течение 30 мин к этой смеси добавляют равный объем 1–2%-ной взвеси эритроцитов. Если сыворотки и антигена взято по 0,25 мл, то добавляют 0,5 мл эритроцитов.

Контролем является проба, где сыворотка заменена физраствором. Реакция читается после выдерживания в течение 30 мин в термостате или 45 мин при комнатной температуре.

При положительной РТГА на дне пробирки образуется плотный осадок эритроцитов (задержка реакции), имеющий вид «пюфки» или диска.

При отрицательной РТГА отмечается выраженная гемагглютинация в виде «зонтика».

Реакция используется для идентификации и типизации выделенного антигена, титрования вирусосодержащих жидкостей и серологической диагностики вирусных инфекций.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА).

Сущность этой реакции заключается в том, что антиген или антитела (иммуноглобулины) адсорбируют на поверхность эритроцитов, которые приобретают способность агглю-

тинируются в присутствии специфических антител или антигена.

Главными достоинствами РНГА являются высокая чувствительность и специфичность, техническая простота, стабильность используемых компонентов.

РНГА применяют при диагностике инфекционных болезней:

1) для обнаружения и титрования антител в исследуемой сыворотке крови с помощью известного эритроцитарного антигенного диагностикума;

2) для идентификации неизвестного антигена с помощью известного иммуноглобулинового (антительного) эритроцитарного диагностикума.

Учет РНГА проводится так же, как и при постановке РГА.

План работы.

1. Провести постановку РА классическим (пробирочным) методом на бруцеллез с сыворотками крови крупного рогатого скота (учет результатов провести на следующем занятии).

2. Провести постановку и учет результатов РА капельным методом с неизвестным антигеном с использованием набора агглютинирующих сальмонеллезных сывороток.

3. Ознакомиться с результатами демонстрационной реакции гемагглютинации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью применяется РА?
2. Как называются компоненты, участвующие в РА?
3. Какие изменения претерпевает корпускулярный антиген под действием специфических антител в РА?

ТЕМА 14

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

Цель занятия: дать представление о сущности реакции связывания комплемента, применении ее в ветеринарно-лабораторной практике, получении и подготовке компонентов; освоить методы титрации компонентов для РСК, провести постановку главного опыта; ознакомить с различными модификациями проведения РСК.

Материальное обеспечение: пробирки в штативах, пипетки на 1 и 5 мл, водяная баня с терморегулятором; компоненты: физиологический раствор, гемолизин (1:100), эритроциты барана (1:40), комплемент (1:20), единый бруцеллезный антиген для РА и РСК, бруцеллезная (позитивная) и нормальная (негативная) сыворотки; демонстрационные наборы с результатами: проверки компонентов на антикомплементарность и гемотоксичность; титрования гемолитической сыворотки; готовая шкала для оценки степени гемолиза эритроцитов; таблицы по теме.

РСК, как и все серологические реакции, может быть использована в следующих направлениях:

1) для выявления специфических антител в сыворотке крови больных животных с включением в реакцию известного антигена при диагностике бруцеллеза, сапа, листериоза, лептоспироза и др.;

2) для индикации или определения в исследуемом материале специфического антигена с использованием известных иммунных сывороток.

Сущность РСК заключается в том, что при взаимодействии антитела со специфическим для него антигеном происходит процесс связывания комплемента на образовавшемся комплексе, который визуально не проявляется. Для выявления связывания комплемента с комплексом «антиген — антитело» вводится гемолитическая система (ее называют индикаторной), состоящая из гемолитической сыворотки (гемолизина) и эритроцитов барана.

Если антиген и антитело, взятые для исследования, специфичны, то происходит полное связывание комплемента, и гемолиз эритроцитов в гемолитической системе не происходит. На дне пробирки после инкубации в течение 20 мин при 37°C и последующем выдерживании смеси в течение 20–24 ч при комнатной температуре образуется осадок негемолизированных эритроцитов.

Если же антиген и антитело неспецифичны, то комплекс, связывающий комплемент, не образуется, последний остается в свободном состоянии и отклоняется в гемолитическую систему, вследствие чего наступает гемолиз эритроцитов, и исследуемая смесь приобретает красный лаковый цвет. РСК, как и другие реакции иммунитета, протекает при строгих количественных соотношениях, взятых в опыт компонентов и точно оттитрованных количествах комплемента, гемолитической сыворотки, антигена и антител.

Существуют различные модификации реакции связывания комплемента, мы представляем методику постановки РСК при диагностике бруцеллеза. Реакция проходит в водяной бане при 37–38°C в объеме 1 мл (по 0,2 мл каждого компонента — сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина и эритроцитов).

При диагностике сапа и других болезней РСК ставится в объеме 2,5 мл, поэтому каждый из компонентов, входящих в реакцию, берется в объеме 0,5 мл.

Для серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота в ветеринарной лабораторной практике применяется РСК, которую ставят в объеме 1 мл. Для постановки РСК с исследуемой сывороткой необходим ряд компонентов.

1. *Исследуемые сыворотки* берут в стерильные пробирки индивидуально от каждого животного, *контрольные* (положительные и отрицательные) — в ампулах биофабричного производства

с этикеткой. Перед применением их разводят физраствором 1:5 или 1:10 и прогревают в водяной бане в течение 30 мин при 56–58°C для разрушения собственного комплемента. Такая сыворотка называется инактивированной.

2. *Антиген бруцеллезный единый* для РА, РСК, РДСК, изготовленный на биофабрике, представляет собой гомогенную взвесь инактивированных нагреванием и карболовой кислотой бруцелл в физиологическом растворе.

3. *Комплемент* в наибольшем количестве содержится в сыворотке крови морских свинок, поэтому ее используют как компонент в РСК. Удобнее применять лиофильно высушенную сыворотку, которую в настоящее время выпускают предприятия биологической промышленности. Для постановки РСК комплемент вводят в строго определенной дозе, так как и избыток и недостаточное количество его приводят к ложным результатам. Комплемент очень нестойкий, поэтому его активность определяют в *день постановки опыта* в присутствии антигена в бактериолитической системе, а также на позитивной и негативной сыворотках того вида животных, которых исследуют.

4. *Эритроциты барана*: кровь от барана берут из яремной вены с соблюдением правил асептики в колбу со стеклянными бусами и дефибринируют осторожными круговыми движениями (фибрин наматывается на бусы), жидкую фракцию крови фильтруют через марлю. Полученную кровь отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования (15 мин при 1500–2000 об/мин), после чего надосадочную жидкость удаляют, а оставшуюся эритроцитарную массу ресуспендируют в физрастворе и вновь центрифугируют (до трех раз). Данные операции выполняют до тех пор, пока жидкость над эритроцитами не станет прозрачной. Отмытые эритроциты разводят для реакции физраствором 1:40 или готовят 2,5% -ную взвесь эритроцитов (для удобства и точности желательно применять градуированные центрифужные пробирки);

5. *Гемолитическую сыворотку* (гемолизин) получают на биопредприятиях путем гипериммунизации кроликов 25–50% -ной взвесью эритроцитов в физрастворе. Данную взвесь вводят кроликам внутривенно 4–5 раз с 3–4-дневными интервалами. Через 7 дней после последнего введения у кроликов берут кровь.

**Проверка компонентов
на антикомплементарность и гемотоксичность**

Компоненты	Проверка на гемотоксичность				
	Антикомплементарность	Комплемента	Гемолизина	Антигена	Физраствора
Комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	—	—	—
Гемолизин в рабочем титре	0,2	—	0,2	—	—
Антиген в рабочем титре	0,4	—	—	0,4	—
Эритроциты (2,5%-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	—	0,6	0,6	0,4	0,8
Водяная баня при 37–38°C, 10 мин					
Результат	ПГ	НГ	НГ	НГ	НГ

ПГ — полный гемолиз; НГ — нет гемолиза.

Полученную сыворотку инактивируют 30 мин при 56–58°C для разрушения кроличьего комплемента. Гемолизин консервируют глицерином 1:1 или добавлением 0,5% фенола и разливают по ампулам с этикеткой.

Для постановки главного опыта РСК определяют качество и проводят предварительное титрование всех компонентов, используемых в реакции.

1. Вначале проводят проверку компонентов на антикомплементарность и гемотоксичность по схеме, представленной в табл. 6.

При получении таких результатов делают следующее заключение: в реакции используют компоненты, не обладающие антикомплементарными и гемотоксическими свойствами.

2. Титрование гемолизина проводят при получении каждой новой партии и периодически 1 раз в 3 мес. в процессе хранения компонента. Для титрации гемолизина готовят ряд последовательных разведений от 1:500 до 1:4000 по схеме, представленной в табл. 7.

Схема подготовки испытуемых разведений гемолизина

Основные разведения гемолизина 1:100 (мл)	Физиологический раствор, (мл)	Получаемые разведения
0,4	1,6	1:500
0,1	0,9	1:1000
0,1	1,4	1:1500
0,1	1,9	1:2000
0,1	2,4	1:2500
0,1	2,9	1:3000
0,1	3,4	1:3500
0,1	3,9	1:4000

Схема титрования гемолизина

Компоненты	Разведение гемолизина							
	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000
Гемолизин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент (1:20)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Эритроциты (2,5%-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физраствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня при 37–38°C, 10 мин								
Примерный результат	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз.

После приготовления последовательных разведений гемолизина приступают к его титрованию в присутствии комплемента и эритроцитов барана, т. е. в гемсистеме по схеме, представленной в табл. 8.

Титром гемолизина считают наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного 1:20 в течение 10 мин при 37–38°C. Из табл. 8 видно, что *предельный титр гемолизина* равен 1:1500, а *рабочий титр* гемолизина для постановки РСК должен быть в 2 раза выше, т. е. он будет равен 1:750 (его и используют в работе).

После водяной бани учитывается результат.

Для приготовления гемолитической системы берется гемолитическая сыворотка в рабочем титре и 2,5%-ная взвесь эритроцитов в равных объемах.

Титрование комплемента в гемолитической системе. Комплемент титруют в разведении 1:20 в дозах от 0,02 до 0,2 мл с интервалами в дозах по 0,02 мл. После внесения комплемента в каждую пробирку добавляют недостающее до 0,2 мл количество физиологического раствора и остальные компоненты по схеме, как указано в табл. 9.

Титром комплемента в гемолитической системе считают наименьшее его количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в течение 10 мин в водяной бане при 37–38°C. В примере, приведенном в табл. 9, титр комплемента в гемолитической системе равен 0,08.

3. Титрирование комплемента в бактериолитической системе показано в табл. 10.

Таблица 9

Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент (1:20)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Физиологический раствор	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	—
Гемолизин в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,5%-ная взвесь эритроцитов	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня при 37–38°C, 10 мин										
Примерный результат	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Схема титрования компонента в бактериолитической системе

Компоненты	Ряд пробирок	Номера пробирок												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Негативная сыворотка 1:5	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем титре	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Физраствор	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в разведении 1:20	1	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,10	0,12	0,14	0,14	0,16	0,16	0,18	0,20
	2	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,10	0,12	0,14	0,14	0,16	0,16	0,18	0,20
Недостающее количество физраствора	1	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,10	0,08	0,06	0,06	0,04	0,04	0,02	—
	2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,10	0,08	0,06	0,06	0,04	0,04	0,02	—
Водяная баня при 37–38°С, 20 мин														
Гемолитическая система	1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня при 37–38°С, 20 мин														
Примерный результат	1	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	2	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз; НГ — нет гемолиза.

Перед постановкой главного опыта РСК проводят титрование комплемента в бактериолитической системе с позитивной (бруцеллезной), негативной сывороткой крови того вида животных, которых исследуют, и одной сыворотки, взятой из исследуемой партии. Каждую из них разводят 1:5 физраствором (1 мл сыворотки + 4 мл физраствора) и инактивируют.

Сыворотку разливают по 0,2 мл в 2 ряда, в каждой из которых по 10 пробирок. Затем в пробирки каждого ряда вносят комплемент (в разведении 1:20) в возрастающих дозах от 0,02 мл до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл и недостающее до 0,2 мл (в каждой пробирке) количество физраствора.

По такой же схеме проводят титрование комплемента в бактериолитической системе с использованием позитивной и одной из исследуемых сывороток. Титром комплемента в бактериолитической системе считают минимальное его количество в разведении 1:20, вызывающее полный гемолиз 2,5%-ной взвеси эритроцитов в пробирках с негативной и исследуемой сыворотками с антигеном и без антигена, а также в пробирках с позитивной сывороткой без антигена в течение 20 мин в водяной бане при 37–38°C, при задержке гемолиза в пробирках с бруцеллезной сывороткой и антигеном. Определение титра комплемента в бактериолитической системе проводят согласно схеме.

В приведенном примере *титр комплемента* в этой системе равен 0,10 мл. Но в дальнейшем следует учитывать, что активность комплемента в присутствии всех компонентов главного опыта может снижаться, поэтому делают поправку и на *рабочий титр* комплемента, который для главного опыта увеличивают на 0,02 мл. В данном случае он будет составлять 0,12 мл.

Расчет количества комплемента, необходимого для постановки главного опыта, можно показать на следующем примере: на исследование в лабораторию прислали 150 проб с сывороткой крови, на каждую из которых необходимо две пробирки, т. е. всего 300 пробирок. Как видно из табл. 10, титр комплемента составил 0,12 в разведении 1:20. Следовательно, из расчета $0,12 \times 300 / 20 = 1,8$ мл, на 300 пробирок нужно 1,8 мл сыворотки морской свинки. Общий объем разведенного комплемента на 300 пробирок для постановки главного опыта составляет 60 мл (из расчета $300 \times 0,2$ мл = 60 мл).

Флакон с биофабричным лиофилизированным компонентом после восстановления (т. е. внесения 2 мл физраствора) содержит 2 мл нативной сыворотки морской свинки. Для приготовления компонента в установленном разведении на постановку главного опыта нужно к 1,8 мл сыворотки морской свинки добавить 58,20 мл физраствора.

Главный опыт РСК.

При массовых исследованиях реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1:5 с антигеном, при повторном исследовании в разведениях одной сыворотки 1:5 без антигена и 1:5 и 1:10 с антигеном.

При исследовании в одной пробирке берут 0,1 мл сыворотки и добавляют 0,4 мл физраствора (разведение 1:5).

При постановке реакции в трех пробирках в первую наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физраствора (разведение 1:5). Из первой пробирки 0,2 мл переносят во вторую и 0,1 мл — в третью, в которую затем добавляют 0,1 мл физраствора (разведение 1:10).

Реакцию ставят по схеме главного опыта (табл. 11). Главный опыт сопровождается следующими контролями:

- негативная и бруцеллезная сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (по схеме главного опыта);
- гемолитическая система (0,6 мл физраствора и 0,4 мл гемолитической системы).

Учет результатов РСК проводят визуально. При постановке реакций в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят 1 раз — сразу после извлечения штативов из водяной бани; при исследовании в трех пробирках — через 3–4 ч, когда в контрольных пробах с позитивной сывороткой эритроциты осядут на дно пробирки, или на следующий день (пробирки с реакцией хранят в холодильнике).

Результаты реакции оценивают в плюсах по следующей схеме:

- (++++) — отсутствие гемолиза; надосадочная жидкость прозрачная и бесцветная;
- (+++) — гемолиз 25% эритроцитов;
- (++) — гемолиз 50% эритроцитов;
- (+) — гемолиз 75% эритроцитов;

Главный опыт РСК (по Костенко Т. С. и др., 2001)

Компоненты	Номера пробирок и дозы компонентов						
	1	2	3	4	5	6	7
Исследуемая сыворотка 1:5 или (1:10)	0,2	—	—	0,2	—	—	—
Позитивная сыворотка	—	0,2	—	—	—	—	—
Негативная сыворотка			0,2	—	—	—	—
Антиген в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—	—
Физиологический раствор	—	—	—	0,2	0,2	0,4	0,6
Комплемент в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Водяная баня 37°C, 20 мин							
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Предполагаемый результат	?	НГ	ПГ	?	ПГ	ПГ	НГ
Водяная баня 37°C, 20–30 мин							

- (–) — полный гемолиз эритроцитов; осадок отсутствует; жидкость интенсивно окрашена гемоглобином.

За положительный результат РСК принимают задержку гемолиза на два креста и более. Учет результатов начинают всегда с контрольных пробирок. Седьмая пробирка: контроль физиологического раствора и гемсистемы; гемолиза не должно быть. Шестая пробирка: контроль комплемента и гемсистемы; должен быть полный гемолиз. Пятая пробирка: контроль антигена; должен быть полный гемолиз (нет антикомплементарности антигена). Четвертая пробирка: контроль антикомплементарности исследуемой сыворотки (безантигенный ряд); должен быть полный гемолиз. При задержке гемолиза (антикомплементарность сыворотки) от данного животного необходимо брать кровь для повторного исследования. Третья пробирка: контроль негативной сыворотки; должен быть полный гемолиз. Вторая пробирка: контроль позитивной сыворотки; должна быть задержка гемолиза.

При прохождении всех этапов контроля, включая проверку исследуемой сыворотки на антикомплементарность, можно

Приготовление шкалы степени гемолиза

Компоненты	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
Гемолизирующая жидкость	1,0	0,75	0,5	0,25	—
Физиологический раствор	—	0,25	0,5	0,75	1,0
Процент гемолиза	100	75	50	25	0

учитывать результат в пробирке с исследуемой сывороткой и антигеном (первая пробирка). Результат в зависимости от состояния животного в этом случае может варьировать от «++++» — положительная РСК до «-» — отрицательная РСК.

Степень задержки гемолиза эритроцитов определяют по шкале, которую готовят перед учетом реакции. Для этого из реакции выбирают 5 пробирок с полным гемолизом и жидкость из них сливают в одну. Из данной смеси готовят разведения с меньшим процентом гемолиза по схеме, представленной в табл. 12.

Степень гемолиза в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют путем сравнения со степенью гемолиза в пробирках шкалы, процент гемолиза выражают в плюсах.

Диагностическая оценка. При исследовании сывороток в одной пробирке (в разведении 1:5 с антигеном) все сыворотки, давшие задержку гемолиза на один плюс и выше, исследуют повторно в тот же или на другой день в трех пробирках в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена.

Реакцию считают положительной при задержке на 2–4 плюса в одном или двух разведениях сыворотки (1:5 или 1:10) и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена); сомнительной — при задержке гемолиза с оценкой один плюс. При получении сомнительного результата сыворотки крови от животных через 15–20 дней исследуют повторно. При этом животных, с сывороткой крови которых получена дважды сомнительная реакция, считают реагирующими положительно.

Реакцию длительного связывания компонента (РДСК), как более чувствительную, применяют вместо РСК при исследовании на бруцеллез, туберкулез, кампилобактериоз. Основные принципы постановки РДСК от РСК мало чем отличаются друг от друга.

Особенность данной реакции заключается в том, что при постановке главного опыта бактериолитическую систему последовательно выдерживают при трех температурных режимах:

- 1) при комнатной температуре 15 мин;
- 2) при 4°C в холодильнике, 18–20 ч;
- 3) на водяной бане при 37–38°C 15 мин.

После добавления компонентов, входящих в гемолитическую систему, пробирки с реакцией помещают в водяную баню при 37–38°C на 10 мин.

Результаты РДСК учитывают точно так же, как и при РСК.

План работы (для трех занятий).

Первое занятие по РСК.

1. Провести учет РА, поставленной на прошлом занятии пробирочным методом, на бруцеллез с сыворотками крови крупного рогатого скота.

2. Изучить сущность РСК и ознакомиться с ее компонентами.

3. Ознакомиться с результатами проверки компонентов на антикомплементарность и гемотоксичность.

4. Ознакомиться с результатами титрования гемолитической сыворотки.

Второе занятие по РСК.

Провести постановку и учет результатов титрования компонента в бактериолитической системе.

Третье занятие по РСК.

Провести постановку и учет главного опыта РСК.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью при постановке РСК исследуемую сыворотку инактивируют?
2. При постановке главного опыта РСК на бруцеллез в одной из проб «нет гемолиза». Дайте диагностическую оценку реакции.
3. При титровании гемолизина установлен предельный титр 1:2000, назовите рабочий титр гемолизина.
4. При постановке РСК на бруцеллез с сывороткой крови больного животного допущена неточность: в пробирку внесено компонента больше, чем установлено при титровании. К каким результатам может привести эта оплошность (ПГ, ЧГ, НГ)?
5. Почему при постановке РСК возникает необходимость во второй гемолитической системе?

ТЕМА 15

МЕТОД ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (МФА). ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Цель занятия: сформировать у студентов общее представление о методах флуоресцирующих антител и способах постановки реакции иммунофлуоресценции; ознакомить с сутью, компонентами, оборудованием и методами проведения иммуноферментного анализа.

Материальное обеспечение: предметные стекла; исследуемый материал (бактериальная культура бруцелл, сальмонелл, патологический материал); специфическая люминесцирующая сыворотка; физиологический раствор; фосфатный буфер с рН 7,2–7,4 для промывания мазков; влажная камера (чашки Петри с увлажненной ватой); фильтровальная бумага; нефлуоресцирующее иммерсионное масло; люминесцентный микроскоп, размещенный в затемненной комнате. Для выполнения твердофазного иммуноферментного метода: полистироловая планшета с заранее поставленной цветной реакцией, так как продолжительность постановки ИФА (5–6 ч) не вписывается в учебное время. Иммунологический планшет; специфические сыворотка или иммуноглобулины; фосфатный буфер рН 7,2–7,4 с твин-20; специфический антиген (для контроля — неспецифический антиген); шприц-дозатор; пероксидазный антивидовой конъюгат (антивидовая меченая сыворотка); субстратная смесь (индикатор ортофенилендиамин с 3% -ным раствором перекиси водорода).

В серологических реакциях — МФА и ИФА — используют антитела, меченные флуорохромами или ферментами, в про-

цессе постановки этих реакций, применяя специальные методы исследования, четко фиксируется образование иммунного комплекса. В некоторых методах ИФА ферментную метку вводят в антиген.

Методы флуоресцирующих антител (МФА).

Эти методы основаны на принципе серологических реакций, когда происходит взаимодействие специфического антигена со специфическими антителами, с образованием иммунного комплекса, но антитела здесь предварительно мечены флуорохромом (изотиоционатфлуоресцеином). Данные методы являются по своей сущности разновидностью серологических реакций, но ставятся на предметном стекле (в мазке), а образовавшийся комплекс «антиген + антитело» обнаруживают по издающей свечению метке при исследовании мазка под люминесцентным микроскопом.

В настоящее время налажено производство флуоресцирующих сывороток и глобулинов централизованным путем. Они выпускаются в сухом виде в ампулах, к которым есть приложения с инструкцией по применению и с указанием титра сывороток.

МФА можно разделить на две разновидности.

1. Прямой МФА:

- 1) исследуемый антиген (мазок);
- 2) меченые специфическая сыворотка или γ -глобулин.

2. Непрямые МФА:

1) с использованием антивидовой флуоресцирующей сыворотки:

- исследуемый антиген (мазок);
- немеченые специфическая сыворотка или γ -глобулин;
- меченая антивидовая сыворотка;

2) с использованием антикомплементарной флуоресцирующей сыворотки:

- исследуемый антиген (мазок);
- немеченые специфическая сыворотка или γ -глобулин;
- комплемент;
- меченая антикомплементарная сыворотка.

Прямой МФА технически прост и специфичен по результативности. При выявлении возбудителя-антигена на предметное

стекло наносят препарат-отпечаток из исследуемого органа (или взвесь бактерий), высушивают на воздухе и фиксируют химическим методом, погружая в метанол на 5 мин. В центр препарата наносят 2–3 капли меченой сыворотки или γ -глобулина в рабочем титре и выдерживают в термостате 30 мин во влажной камере (чашка Петри с увлажненной ватой). Затем мазок тщательно промывают от не вступивших в прочную связь иммуноглобулинов каким-либо буферным раствором и дистиллированной водой. Высушивают мазки и просматривают под иммерсионной системой микроскопа. Если антиген и антитела специфичны, то на темном фоне будет отчетливо видно салатно-зеленое свечение антител, адсорбированных на антигенах. Если же нет (или антигена в мазке не было), то свечение отсутствует, так как антитела удаляются с препарата при промывании водой. К недостаткам прямого МФА относится и то, что при идентификации неизвестного антигена в лаборатории нужно иметь на каждый возбудитель специфическую люминесцирующую сыворотку (или глобулин), а они сравнительно дорогие и имеют небольшой срок хранения.

Непрямые МФА носят такое название потому, что флуоресцирующая сыворотка (антитело) при данных методах адсорбируется не на антигене, а на посреднике (на специфическое неокрашенное антитело или на комплемент, которые являются для флуоресцирующих антител антигеном).

Непрямой МФА (двухступенчатый) с использованием антивидовой флуоресцирующей сыворотки считается более универсальным, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки появляется возможность выявлять различные виды микроорганизмов. Сущность и техника данного метода заключается в том, что на фиксированный мазок сначала наносят специфическую для предполагаемого в мазке антигена немеченую иммунную сыворотку или глобулин (антитела сыворотки первой ступени) и выдерживают во влажной камере при 37°C 30 мин. Затем мазок обильно промывают фосфатным буфером или просто дистиллированной водой. Если в мазке имеется специфический антиген, то образуется прочный комплекс «антиген — антитело», который при промывании мазка не исчезает. Однако полученный комплекс невидим и чтобы его обнаружить в люминесцентном микроскопе, мазок дополни-

тельно обрабатывают флуоресцирующей антивидовой сывороткой или глобулинами (сыворотка второй ступени). Антивидовые сыворотки или глобулины получают путем гипериммунизации кролика (или других видов животных) сывороткой или глобулинами того вида животных, от которых получают специфическую антигену гипериммунную неспецифическую сыворотку. Для этого на мазок наносят антивидовую флуоресцирующую сыворотку и снова контактируют во влажной камере при 36–37°C 30 мин. Затем мазок промывают и высушивают на воздухе. В результате антивидовая сыворотка адсорбируется на комплекс «антиген — антитело» и, поскольку антивидовая сыворотка или глобулины меченые, вновь образовавшийся комплекс «антиген + антитело + антивидовое антитело» при микроскопии издает салатово-зеленоватое свечение.

Если же в первой стадии компоненты были неспецифичны, то комплекс «антиген — антитело» не образуется, и антивидовые антитела не свяжутся, при промывании мазка они смоются с него и при микроскопии характерного свечения не будет.

Непрямой МФА с использованием антикомплементарной флуоресцирующей сыворотки (трехступенчатый МФА) по своей сущности и технике является разновидностью РСК, которая ставится на предметном стекле, и роль гемолитической системы выполняет флуоресцирующая антикомплементарная сыворотка.

Для подтверждения специфичности результатов МФА необходим следующий контроль: для прямого варианта проводят окраску гомогенных и гетерогенных в антигенном отношении микроорганизмов люминесцирующей сывороткой. Свечение бактерий должно быть в первом случае и отсутствовать во втором.

Для непрямого метода ставят два контроля.

1. Мазки, содержащие гомологичные и гетерологичные в антигенном отношении микроорганизмы, обрабатывают антивидовой люминесцирующей сывороткой. Бактериальные клетки не должны светиться, так как нет антител первой ступени.

2. Мазки с гомологичными и гетерологичными бактериями обрабатывают иммунной (антимикробной) сывороткой (1-й этап) с последующим нанесением флуоресцирующей антиглобулиновой сыворотки (2-й этап). Специфическое свечение бактерий должно быть в первом случае и отсутствовать во втором.

Интенсивность свечения оценивается по четырехбалльной системе: «++++» — очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки; «+++» — яркая флуоресценция периферии клетки; «++» — слабое свечение периферии клетки; «+» — нет контрастного свечения периферии и тела микробной клетки. Реакция иммунофлуоресценции считается положительной, если специфическое свечение микробных клеток оценивают на четыре или на три плюса.

Имуноферментный анализ (ИФА).

Этот метод основан на взаимодействии антигена и антитела, где в качестве метки в конъюгате (комплекс «антитело + фермент» или «антиген + фермент») используется фермент пероксидаза или другая соответствующая им субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и перекись водорода или ортофенилендиамин и перекись водорода). По чувствительности этот метод в сто и более раз превышает РНГА, РДП и др. Предел чувствительности иммуноферментного метода достигает 1–10 нг/мл специфического белка.

Имуноферментный метод используется для выявления и идентификации микроорганизмов и антител к ним. Различают две разновидности иммуноферментного метода: гетерогенный и гомогенный.

Гетерогенный (в литературе он описан под названием иммуносорбентного — ELISA-теста и РЭМА — реакции энзиммеченых антител (или антигенов)), адсорбированных на поверхности водонерастворимых полимерных материалов.

Гомогенный иммуноферментный метод в основном используется для определения низкомолекулярных антигенов (гормонов, лекарственных препаратов). При данном методе не используется твердая фаза.

Существует ряд основных компонентов, необходимых для выполнения твердофазного иммуноферментного метода.

1. Специфические иммуноглобулины, которые выделяются из гипериммунной сыворотки осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой.

2. Антивидовые глобулины, выделяемые из антивидовых сывороток осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой.

3. Белок А, выделяемый из золотистого стафилококка, или бычий сывороточный альбумин.

4. Антиген, приготовляемый из органов зараженных животных. Это заведомо положительные или отрицательные антигены.

5. Иммунологический планшет из прозрачного полистирола.

6. Фермент пероксидаза, выделяемый из хрена.

7. Конъюгаты (пероксидаза, связанная с антителами или антигеном методом периодатного окисления).

8. Субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и перекись водорода или ортофенилендиамин и перекись водорода).

9. Детергент (поверхностно-активные вещества: твин-20, 80, трилон X-100, сорбиталь с-20).

10. Шприц-дозатор, необходимый для розлива ингредиентов реакции.

Существуют прямой и непрямой методы постановки этой реакции. На практике в основном используется непрямой метод.

Способы постановки иммуноферментного метода для обнаружения специфического антигена: перед постановкой реакции лиофилизированные компоненты растворяют в объеме, указанном на этикетке, 0,01 М раствором фосфатного буфера или дистиллированной водой и доводят до объема рабочих разведений. Количество каждого из компонентов, вносимых поэтапно в лунки планшета, составляет 0,1 мл.

Этапы постановки реакции.

1. Сенсибилизация полистиролового планшета: в лунки планшета вносят специфические антитела (иммуноглобулины) в рабочем разведении, указанном на этикетке. Планшет с антителами инкубируют в термостате при 37°C в течение 3 ч или при 4°C — 18 ч. По окончании инкубации, вытряхнув содержимое лунок, проводят трехкратную отмывку планшета раствором фосфатного буфера, содержащим твин. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.

2. Внесение антигенов: в планшете, сенсибилизированном специфическими антителами, выделяют контрольные ряды, в первый вносят положительный, во второй — отрицательный антигены и ряд для исследуемой пробы в разведениях от 1:10 до 1:1280. Инкубируют в термостате при 37°C в течение 1 ч. Тщательно отмывают лунки как указано выше.

3. Внесение пероксидазного антивидового конъюгата в рабочем разведении с целью выявления комплекса «антиген — антитело»: залитые планшеты помещают в термостат при 37°C на 1 ч. На образовавшемся комплексе «Ат + Аг» адсорбируются антитела, меченные пероксидазой. Затем лунки планшета трехкратно отмывают, чтобы удалить избыток несвязавшихся антител, раствором ФБТ и подсушивают.

4. Внесение ферментного субстрата: для проявления реакции в лунки планшета вносят раствор субстрата, индикатора пероксидазы — ортофенилендиамина, к раствору которого добавляют 3%-ный раствор перекиси водорода, для выявления образовавшегося комплекса «антиген — антитело — конъюгат». Планшеты закрывают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 15–30 мин.

5. Учет реакции проводят визуально или спектрофотометрически. При визуальной оценке положительной реакции с применением ортофенилендиамина содержимое лунок будет оранжевого цвета различной интенсивности. При визуальной оценке реакции учет проводят по четырехплюсовой системе:

- «++++» — интенсивное окрашивание;
- «+++» — оранжевое окрашивание;
- «++» — бледно-оранжевое окрашивание;
- «+» — желтое окрашивание.

Пробу считают положительной при оценке в два плюса и более. За титр антигена принимают наивысшее разведение, при котором в реакции со специфическим антителом наблюдается бледно-оранжевое окрашивание («++»), значительно превосходящее по интенсивности окрашивание контрольных лунок планшета.

При спектрофотометрическом учете результатов реакции производят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном (ОП₁) к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОП₂). Реакцию считают положительной, если коэффициент специфичности выше 2,1, и отрицательной, если ниже 2,1.

Техника постановки иммуноферментного метода для обнаружения (или титрования) антител выполняется как при об-

наружении и идентификации микробного антигена, с той лишь разницей, что материалом является исследуемая сыворотка крови.

План работы.

1. Ознакомиться с флуорохромами, глобулиновыми препаратами, люминесцирующими сыворотками, антивидовыми сыворотками биофабричного приготовления, люминесцентным микроскопом.

2. Приготовить препарат на предметном стекле из кусочка печени здорового животного и нанести на еще влажный препарат каплю культуры из вакцинного штамма бруцелл (сальмонелл); распределить тонким слоем; высушить; зафиксировать и обработать его специфической меченой сывороткой согласно методическим указаниям. Провести идентификацию культуры возбудителя бруцеллеза или сальмонеллеза прямым методом МФА.

3. Провести микроскопию препаратов под иммерсионной системой люминесцентного микроскопа. Зарисовать микрокартину.

4. Используя твердофазный иммуноферментный метод, провести оценку демонстрационной реакции по интенсивности окрашивания реакционной жидкости.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем заключается сущность прямого МФА? В чем заключается сущность непрямого МФА?
2. С какой целью применяется МФА?
3. Какова сущность иммуноферментного метода и его отличие от других серологических реакций?
4. С какой целью используют иммуноферментный метод?

ТЕМА 16

Использование в микробиологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) и применение ДНК-зондов

Цель занятия: изучить сущность полимеразной цепной реакции; ознакомиться с компонентами и методом ее постановки; изучить сущность реакции гибридизации нуклеиновых кислот (ДНК-зонды), ознакомиться с ее компонентами и методами постановки.

Материальное обеспечение: набор компонентов для постановки полимеразной цепной реакции; амплификатор; аппарат для электрофореза; трансиллюминатор; набор компонентов, реактивов для постановки реакции ДНК-зондов, приборы и аппаратура: аппарат для горизонтального электрофореза, вакуум-шкаф с подогревом, счетчик радиоактивности, настольная центрифуга на 10 тыс. об/мин, рентгенкассета с усиливающими экранами.

Полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция, разработанная в последние годы, находит все большее использование в микробиологии. С ее помощью можно быстро и надежно провести диагностику инфекционных болезней животных и человека путем индикации возбудителя в исследуемом материале на генетическом уровне.

Вначале из патологического материала или изучаемой микробной культуры методом щелочного гидролиза выделяют ДНК-образец, с которым проводят полимеразную цепную реакцию, т. е. амплификацию заданного фрагмента ДНК-гена. При этом происходит образование дополнительных копий гена

в пробирке заданного участка ДНК-образца. Для этого в пробирку с данным образцом вносят основные компоненты — праймер (затравку), трифосфаты, ДНК-полимеразу. Праймер представляет собой олигонуклеотид, состоящий из 15–20 нуклеотидов. Его получают путем химического синтеза на автоматическом синтезаторе «Виктория», пользуясь данными о первичной структуре (нуклеотидной последовательности) ДНК определенного вида микроорганизма.

Смесь четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов (dGTR, dATP, dCTP, dTTP) — дезоксигуанин — аденин, цитозин, тимин, трифосфорная кислота. ДНК-полимераза — фермент, способный использовать полинуклеотиды как матрицы и строить комплементарные им новые нуклеотидные цепи.

Пробирки помещают в амплификатор — прибор, который позволяет поддерживать строго заданный температурный режим и осуществлять полимеразную цепную реакцию.

Сущность ПЦР заключается в том, что молекулу ДНК подвергают температурному плавлению, т. е. нагреванию до 90–94°C, что ведет к денатурации — разрушению водородных связей между азотистыми основаниями двойной спирали, а затем охлаждают (отжиг) до 52°C в присутствии праймера, фермента ДНК-полимеразы и всех четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов. Последующее повышение температуры до 70–72°C приводит к синтезу новой молекулы ДНК, комплементарной матричной. Эту процедуру (плавления, отжига и синтеза ДНК) повторяют многократно, в результате чего количество выбранного фрагмента ДНК увеличивается.

Продолжительность реакции определяется числом циклов, необходимых для синтеза ДНК-амплификата в достаточном количестве для дальнейшего исследования или индикации. Индикация производится с помощью электрофореза или с помощью меченого ДНК-зонда.

Методика постановки полимеразной реакции.

1. Получение ДНК-образца (лизатов, исследуемого материала). Для этого исследуемый материал суспендируют в буфере или дистиллированной воде, добавляют 1 М раствор NaOH и выдерживают при 37°C в течение 6–7 мин. Смесь нейтрализуют добавлением трис-(оксицетил)аминометана (рН 6,0). Лизат центрифугируют при 5000 об/мин на протяжении 10 мин для

осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК и РНК, используют для постановки ПЦР.

2. Проведение полимеразной цепной реакции — амплификация данного фрагмента (ДНК-гена). Для этого вносят буферный раствор (буфер для ПЦР (10×)-500 мМ КСl, 100 мМ трис НСl, 14, 15 мМ MgСl, 0,1% желатина или бычьего сывроточного альбумина, рН 8,0), фермент ДНК-полимеразу, праймер — олигонуклеотид-затравку, трифосфаты — предшественники синтеза ДНК, исследуемый образец ДНК или биологическая жидкость — кровь, моча, слюна, мокрота и т. д.

3. В пробирку емкостью 1,5 мл (эппендорф) собирают смесь, состоящую из:

- 125 мкл бидистиллированной стерильной воды;
- 15 мкл буфера для ПЦР;
- 5 мкл раствора трифосфатов;
- 3 мкл раствора праймера;
- 3 мкл раствора ДНК-полимеразы термостойкой.

Смесь разливают в пять пробирок (емкостью 0,5 мл) по 30 мкл. В каждую из них вносят по 0,5–1 мкл надосадочной жидкости из лизата, перемешивают, сверху наслаивают по 25 мкл стерильного вазелинового масла. Включают амплификатор и устанавливают режим работы:

- плавление: 92°С в течение 60 с;
- отжиг ДНК: 55°С в течение 60 с;
- синтез ДНК: 70°С в течение 75 с.

В стадии плавления пробирки устанавливают в амплификатор; проводят 80 циклов амплификации, что занимает 3 ч, и за этот срок из одной молекулы ДНК образуется до 1 млн молекул-копий. Реакцию останавливают на стадии «синтеза» и в этой стадии выдерживают 3–5 мин для окончательного досинтезирования фрагментов ДНК.

Полученные пробы молекул ДНК подвергают электрофорезу в агарозном геле. Для этого готовят 1,7% -ный раствор агарозы с этидий бромидом (краситель), разливают на подложку и устанавливают пластинку с зубцами для образования лунок. Через 10–15 мин агароза полимеризуется (застывает).

Пластинку с зубцами осторожно снимают, при этом на агарозе образуются лунки. В аппарат для электрофореза заливают буфер и устанавливают электроды.

В полученные в агарозе лунки вносят пробы:

- амплификат;
- праймер (свидетель);
- лизат, полученный из исследуемого материала.

Электрофорез проводят в режиме 4–5 В/см. Через 40–50 мин аппарат отключают, вынимают пластинку с агарозой и в течение 10 мин окрашивают в 1,7% -ном растворе этидия бромидом. Агарозную пластинку помещают на трансиллюминатор, освещают ультрафиолетовыми лучами и фотографируют.

Полосы в агарозной пластинке, выявляемые при ультрафиолетовом освещении, являются фрагментами ДНК, синтезированными в процессе амплификации со специфическим для каждого возбудителя праймером.

На электрофореграмме выявляют расположение полос, которое зависит от электрофоретической подвижности компонентов реакции. Положительной реакцией считают расположение полос на электрофореграмме на одном и том же уровне, что указывает на идентичность амплификата и праймера. При отрицательных пробах и контроле совпадения полос не происходит или они отсутствуют.

Использование в микробиологии ДНК-зондов.

Метод ДНК-зонды основан на уникальном свойстве генетического материала организма — молекулы ДНК, состоящей из мононуклеотидов, — образовывать двойную спираль путем комплементарного соединения азотистых оснований. Молекула ДНК образует двойную спираль, при которой азотистые основания первой цепи строго комплементарно соединяются водородными связями с азотистыми основаниями второй цепи, где аденин соединяется с тиминном, гуанин — с цитозином.

Принцип метода состоит в том, что структуру двойной спирали ДНК (или РНК) можно разрушить нагреванием, и при этом происходит разделение цепей. Этот процесс называется денатурацией или плавлением ДНК. Температуру, при которой происходит разделение цепей ДНК, называют точкой плавления, которая равняется 85–95°C. Данный процесс обратимый, т. е. при снижении температуры происходит восстановление связей — образование двойной спирали. Это явление называют ренатурацией. Если при ренатурации взяты молекулы из разных

источников, говорят о гибридизации. Способность к гибридизации двух препаратов нуклеиновых кислот является строгим тестом на комплементарность их последовательностей.

Гибридизацию можно осуществлять в растворе или на фильтре (капроновом или нитроцеллюлозном). Удобным для работы является метод гибридизации с использованием фильтров. При этом один из препаратов ДНК иммобилизируют на нитроцеллюлозных фильтрах, на которых молекула ДНК адсорбируется. Затем их погружают в раствор, содержащий второй препарат денатурированной ДНК (ДНК-зонд). Связывание ДНК-зонда происходит только в том случае, если она имеет последовательность нуклеотидов, комплементарную первоначально адсорбированной на фильтре молекуле ДНК.

Эффективность гибридизации определяют по количеству метки, оставшейся на фильтре. Метод является очень чувствительным. При этом необходимо иметь меченные радиоактивным изотопом РНК или ДНК-зонды, идентификация которых с исследуемой молекулой регистрируется с помощью радиоавтографии.

В качестве ДНК-зонда используют меченые копии ДНК с известной последовательностью нуклеотидов.

Метод блоттинга по Саузерну. Для идентификации гена молекулу ДНК-генома расщепляют с помощью ферментов рестриктаз на куски размером примерно по 15–20 тыс. пар нуклеотидов.

Расщепленный таким образом геном подвергается электрофоретическому фракционированию в агарозном геле. После этого фракции ДНК денатурируют нагреванием и переносят из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр, где их иммобилизируют. Процесс переноса ДНК напоминает промокание и называется методом блоттинга по Саузерну, его сущность заключается в том, что агарозный гель помещают на фильтровальную бумагу, замоченную в концентрированном солевом растворе, а затем на гель накладывают нитроцеллюлозный фильтр и сверху помещают сухую фильтровальную бумагу.

Для того чтобы солевой раствор впитался в сухую бумагу, ему необходимо пройти сквозь агарозный гель и затем через нитроцеллюлозный фильтр. ДНК переносится вместе с соевым раствором, но задерживается нитроцеллюлозой. Иммобилизо-

ванную таким образом ДНК можно гибридизировать на месте с радиоактивным зондом. Со специфичным зондом будут гибридизоваться только комплементарные ему фрагменты. Так как зонд радиоактивный, то гибридизацию можно обнаружить с помощью автордиографии.

Каждая комплементарная последовательность проявляется в виде радиоактивной полосы, месторасположение которой определяется размером фрагмента ДНК.

Метод блоттинга является высокочувствительным и широко применяется в различных областях, в том числе для диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, например для обнаружения возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза, туберкулеза, ящура, чумы свиней, чумы птиц, энтеровирусов и т. д.

Метод геной дактилоскопии заключается в анализе гипервариабельных участков молекул ДНК, который включает следующие этапы: выделение ДНК и фрагментация ее с помощью электрофореза в геле. Фрагменты, содержащие гипервариабельные участки, выявляют автордиографически с помощью специального зонда — «проба Джеффриса», с которой они связываются путем гибридизации.

В качестве радиоактивного зонда может быть использована ДНК, выделенная из бактериофага М-13.

Метод точечной (дот) гибридизации выполняется путем внесения исследуемых образцов ДНК в денатурированном состоянии на капроновые мембранные фильтры в виде точек. Например, ДНК микобактерий туберкулеза крупного рогатого скота в количестве 3 мкл (1,8 мкг/мл) в виде точек наносится в квадраты (1,5×1,5 см). Одноцепочечные молекулы ДНК (денатурированные) адсорбируются на мембране и фиксируются. После этого на фильтр наносится ДНК-зонд, одноцепочечная молекула ДНК, выделенная, например, из *Myc. bovis*, меченная радиоактивным фосфором.

В случае совпадения азотистые основания молекул ДНК *M. bovis* и меченая ³²P ДНК-зонда комплементарны, т. е. происходит связывание азотистых оснований с образованием двойной спирали. После этого несвязанные молекулы ДНК-зонда отмываются, и образующиеся гибридные молекулы выявляют радиоавтографически.

Методика постановки ДНК-гибридизации по индикации возбудителя бруцеллеза включает в себя два основных этапа: подготовка проб исследуемого материала и приготовление ДНК-зондов.

Подготовка проб исследуемого материала.

1. Берут небольшие кусочки (0,3–0,2 г) органов, тканей, гомогенизируют их путем растирания с кварцевым песком и добавлением физиологического раствора.

2. Лизис клеток проводят с добавлением 10% -ного водного раствора додецилсульфата, доводя его концентрацию до 0,5–1,0% и проназу до 500 мкг/мл. Смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин.

3. Добавляют равный объем смеси хлороформ-изоамилового спирта, энергично встряхивают и центрифугируют при 10 тыс. об/мин. Верхнюю водную фазу осторожно переносят в другую пробирку и добавляют 2,5 объема холодного 96% -ного этанола. При этом ДНК выпадает в осадок.

4. Осажденную ДНК подсушивают на воздухе и растворяют в 10–20 мкл воды.

5. Берут капроновый фильтр, расчерчивают на квадраты со сторонами 1,5×1,5 см и на них в несколько приемов наносят растворенный осадок, предварительно подогретый до 100°C.

6. Фильтры подсушивают и выдерживают 2 ч под вакуумом при 80°C.

Фильтры с зафиксированными на них образцами можно долго хранить при комнатной температуре в вакууме.

Приготовление ДНК-зондов.

1. Из бруцелл выделяют ДНК и озвучивают ее ультразвуком при 22 кГц в течение 1 мин.

2. Полученные фрагменты ДНК метят радиоактивным фосфором методом трансляции. Для этого радиоактивный трифосфат (ТТР) в количестве 60 мк-Кюри выпаривают под вакуумом при комнатной температуре. В эту же пробирку добавляют 5 мкл (5 мкг) озвученной ДНК, по 2 мкл всех остальных трех немеченых трифосфатов, 4 мкл 10-ник-буфера, 2 мкл ДНК-полимеразы 1 и 2 мкл ДНК-азы, разведенной 10 тыс. раз. Все это перемешивают и ставят на 2 ч при 15°C. Очистку зонда от невключившихся трифосфатов производят на колонке с сефадексом Ж-50. После этого этапа зонд готов для дальнейшей работы.

3. Капроновые фильтры с исследуемой ДНК запаивают в полиэтиленовые пакеты, оставив отверстие для внесения предгибридизационной смеси.

Состав предгибридизационной смеси: формамид — 1,0 мл; 20×ССЦ (3 М, 0,3 М цитрат натрия) — 1,2 мл 100-х смеси Денхарда (1х 20-го раствора фикола, 2% -ный поливинилпирролидина, 2% -ного бычьего сывороточного альбумина) — 0,6 мл, ДНК из спермы лосося — 0,14 мл.

ДНК из спермы лосося предварительно денатурируется кипячением при 100°C в течение 5 мин. В пакет с фильтром вносят предгибридизационную смесь из расчета 0,5 мл на см² фильтра и инкубируют при 46°C 2 ч.

4. Предгибридизационную смесь выливают, и в пакет вносят гибридизационную смесь, состоящую из раствора, указанного в п. 3, а также денатурированную ДНК из спермы лосося, ДНК-зонд. Смесь инкубируют при 46°C в течение 16–20 ч (оставляют на ночь).

5. Гибридизационную смесь выливают и отмывание фильтров проводят в следующем режиме: в растворе состава 2×ССЦ — 0,1% ДДС 2 раза по 15 мин при комнатной температуре, в таком же растворе при 60°C по 15 минут 2 раза. В конце фильтры ополаскивают в 0,1×ССЦ 2 раза и высушивают при комнатной температуре.

6. Для учета реакции проводят радиоавтографию или радиоактивность определяют на счетчике.

7. Радиоавтографию проводят в следующем порядке: в рентгеновскую кассету (на экран) лейкопластырем приклеивают лист обычной бумаги, на него крепят фильтр после гибридации и на последнюю накладывают в темноте рентген-пленку. Рентген-кассету закрывают, помещают в полиэтиленовый пакет и оставляют на ночь при –70°C или –20°C. После холодильника кассету выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, затем в темноте вынимают пленку, проявляют и изображение закрепляют.

При наличии бруцелл в тканях в тех квадратах фильтра, куда они были нанесены, на пленке появляются черные пятна.

После установления бруцелл в исследуемых пробах необходимо определение видовой принадлежности бруцелл, которое проводится методом мультилокусной геномной дактилоскопии.

План работы.

1. Ознакомиться с оборудованием, аппаратурой, компонентами для проведения реакции ДНК-зондов.
2. Провести фрагментально постановку реакции ДНК-зондов.
3. Ознакомиться с оборудованием, приборами, компонентами, реактивами, используемыми для постановки ПЦР.
4. Провести фрагментально постановку.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем сущность и принципы проведения ДНК-зондов?
2. В чем заключается метод геной дактилоскопии?
3. Дайте характеристику структуры ДНК.
4. В чем сущность принципа комплементарности ДНК?
5. Преимущества ПЦР при диагностике инфекционных болезней по сравнению с другими методами.

ТЕМА 17

Индикация возбудителя колибактериоза (эшерихиоза)

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

Материальное обеспечение: пробирки с посевами кишечной палочки на МПА, МПБ, на агаре Эндо, Левина, Симмонса; среды Гисса с посевами *E. coli*, тесты на индол; набор красок по Граму, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовки, микроскопы, иммерсионное масло, диагностические агглютинирующие О-коли сыворотки для РА на предметном стекле; биопрепараты; таблицы «Схема бактериологической диагностики инфекционных болезней, короткий пестрый ряд (среды Гисса)».

В связи с трудоемкостью и длительностью серологической дифференциации *E. coli* нужно заранее подготовить культуру и провести только демонстрацию РА на предметном стекле с поливалентной и моновалентной сыворотками.

Возбудителями колибактериоза (эшерихиоза) являются энтеропатогенные варианты *E. coli*, род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*. Колибактериоз — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных, включая птиц и пушных зверей. Исследования антигенного строения кишечной палочки показали, что возбудителями заболеваний являются патогенные серогруппы *E. coli*:

- у телят чаще выделяются серогруппы 08, 09, 015, 0101 и др;
- у поросят — 08, 09, 0137, 0138 и др;
- у человека — 026, 055, 0111 и др.

Лабораторная диагностика.

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

Материалом для исследования служат кусочки паренхиматозных органов или трупы целиком (в зависимости от веса животных). Для прижизненной бактериологической диагностики колибактериоза в лабораторию посылают фекалии в стерильных пробирках не менее чем от пяти больных животных, не подвергавшихся лечению химиотерапевтическими препаратами.

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

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

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

На второй день просматривают чашки с посевами и отбирают колонии, характерные для эшерихий: круглые, S-формы, красные с металлическим блеском на Эндо, темно-фиолетовые на среде Левина, кирпично-красные — на бактоагаре Плоскирева. Далее для выделения чистой культуры типичные для *E. coli* колонии отсевают на МПА и МПБ, у выделенных культур изучают морфологические, культуральные и ферментативные свойства.

Ферментацию лактозы устанавливают посевом исследуемой культуры на среды Гисса, для *E. coli* характерно расщеп-

ление лактозы, глюкозы и маннита с образованием кислоты и газа.

Для установления способности выделенной культуры расщеплять мочевины и образовывать сероводород ее вносят в трехсахарный агар с мочевиной и выращивают 24 ч в термостате при 37°C. Бактерии кишечной палочки не расщепляют мочевины и не образуют сероводород, поэтому цвет среды не изменяется и столбик агара не чернеет.

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

Серологическая идентификация *E. coli*.

Для серологической идентификации выделенной *E. coli* применяют поливалентные и моновалентные О-коагилирующие сыворотки, выпускаемые биологической промышленностью в лиофилизированном виде (по инструкции перед применением во флакон добавляют физраствор до первоначального объема). Серогрупповую принадлежность эшерихий определяют только у культур, отнесенных по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду эшерихий.

Для серологической идентификации готовят суточную культуру изучаемой кишечной палочки на скошенном МПА, которую смывают физраствором и смыв переносят в две сухие стерильные пробирки:

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

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

Обе прогретые культуры центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок используют в качестве антигена для постановки РА на предметном

стекле. Оставшуюся часть антигена разводят физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \cdot 10^8$ мл и ставят пробирочную реакцию.

Определение серогрупповой принадлежности культур начинают с постановки РА на стекле с групповыми поливалентными сыворотками (их пять — 1, 2, 3, 4 и 0157):

- 1-я поливалентная содержит антитела против серотипов 01, 02, 04, 08, 078, 0111, 0115, 0126;
- 2-я поливалентная содержит антитела против серотипов 09, 015;
- 3-я поливалентная содержит антитела против серотипов 033, 035;
- 4-я поливалентная содержит антитела против серотипов 0555, 0127;
- 5-я поливалентная содержит антитела только против серотипа 0157.

На чистые предметные стекла наносят по капле поливалентных сывороток взятых из набора, в каждую каплю сыворотки петлей вносят прогретую, осажденную центрифугированием культуру *E. coli*, и хорошо перемешивают. Реакция протекает при температуре 18–20°C, учитывают ее в течение 3 мин.

Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и полным или частичным просветлением жидкости в капле только с одной групповой сывороткой. Положительная РА с поливалентной сывороткой подтверждает принадлежность этой культуры к роду *Escherichia*. При отрицательном результате РА антиген не изменяется (не склеивается) и остается в виде равномерной взвеси.

Для окончательного определения серогруппы каждую культуру, которая агглютинируется одной из испытанных поливалентных сывороток, исследуют в РА на стекле с моновалентными, входящими в состав данной поливалентной сыворотки, разведенными 1:10.

Исследуемую культуру относят к той серогруппе (определяют по этикетке), с сывороткой которой она дает положительную реакцию.

Постановка РА сопровождается следующими контролями:

1) антиген, приготовленный из выделенной кишечной палочки + физраствор (для исключения самоагглютинации кон-

тролируют качество антигена и физраствора); реакция должна быть отрицательной;

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

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

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

Биопроба для определения патогенных свойств. Выделенную культуру сутки выращивают на МПА при 37°C, затем смывают физиологическим раствором, готовят суспензию концентрацией 1 млрд микробных клеток в 1 мл по оптическому стандарту мутности. Трех белых мышей массой 14–16 г заражают внутрибрюшинно введением 0,5 мл бактериальной суспензии. За животными наблюдают в течение трех суток, в случае гибели двух (и более) зараженных мышей выделенную культуру считают патогенной.

Обнаружение грамтрицательных палочек, образующих характерные колонии на дифференциально-диагностических и элективных средах, ферментирующих лактозу и маннит, образующих индол, не расщепляющих мочевины, не разжижающих МПЖ, не образующих сероводород, дающих положительную реакцию с метиловым-красным и отрицательную реакцию Фогес — Проскауэра, образующих лизиндекарбоксилазу, не растущих на среде Симмонса, а также дающих положительную серологическую реакцию с поливалентными и моновалентными О-коли агглютинирующими сыворотками, указывает на наличие в исследуемом материале бактерий *E. coli*.

План работы.

1. Изучить культуральные и ферментативные свойства *E. coli* на МПА и МПБ, на демонстрационных посевах в средах Гисса, агаре Эндо, Левина.

2. Приготовить препарат из агаровой культуры кишечной палочки, окрасить по Граму, изучить морфологию под иммерсионным объективом.

3. Приготовить препарат «висячая капля» из молодой бульонной культуры *E. coli* и изучить ее подвижность.

4. Познакомиться с биофабричными компонентами для серологической дифференциации *E. coli*. Поставить РА с агаровой культурой *E. coli* на предметном стекле для серологической идентификации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие виды животных восприимчивы к возбудителю колибактериоза?
2. На чем основана дифференциация *E. coli* на агаре Эндо, Левина?
3. Какие видимые проявления реакции происходят при положительной и отрицательной РА на предметном стекле?
4. Каким методом получают специфические сыворотки на биофабрике?

ТЕМА 18

Индикация возбудителя сальмонеллеза

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

Материальное оснащение: посеvy возбудителя сальмонеллеза в пробирках с МПА, МПБ, посеvy *Salmonella* в чашках Петри с элективными средами; фабричный набор О-комплексных и Н-монорецепторных агглютинирующих сальмонеллезных сывороток; стереомикроскоп для изучения культуральных свойств; набор красок по Граму; спиртовки; бактериологические петли; предметные стекла; таблица «Схема бактериологической диагностики».

Возбудители сальмонеллеза — бактерии из рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae*. Сальмонеллы внутри рода идентифицируют по антигенной структуре, известно более 2200 серологических вариантов, каждый из которых характеризуется определенным набором О- и Н-антигенов.

Лабораторная диагностика сальмонеллеза.

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

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

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

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

При первичном (прямом) посеве исследуемого материала применяют плотные элективные среды. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C, изучают культуральные и ферментативные свойства появившихся колоний. На дифференциально-диагностических и элективных средах сальмонеллы растут, образуя характерные колонии:

- на агаре Эндо — круглые, бесцветные или слегка розоватые колонии;
- на агаре Левина сальмонеллы растут в виде круглых, бледных или розовато-фиолетовых колоний.

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

На селективных средах сальмонеллы растут, образуя характерные колонии:

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

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

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

Окончательно вид сальмонелл определяют методом серологической идентификации. Они имеют сложное антигенное строение, у них два основных антигенных комплекса: О-антиген (соматический) и Н-антиген (жгутиковый), имеющие значение при идентификации сальмонелл. В соответствии с содержанием О-антигенов сальмонеллы разделены на ряд серологических групп, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита — А, В, С, D и Е.

Н-антигены могут существовать в двух фазах, выявляемых в серологических реакциях:

- специфической: обозначаются прописными буквами латинского алфавита;
- неспецифической: обозначаются арабскими цифрами или прописными буквами латинского алфавита.

Сальмонеллы, у которых Н-антиген представлен двумя фазами, называются двухфазными, а имеющие антигены одной фазы — монофазными.

Таким образом, при серологической идентификации принимаются во внимание лишь два основных антигена — О и Н, и этот принцип положен в основу антигенной схемы Кауфмана — Уайта.

Серологической идентификации подлежат только чистые культуры бактерий, отнесенные по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду сальмонелл.

Предприятиями биологической промышленности выпускаются наборы сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сывороток. Эти наборы позволяют определить родовую и серовариантную принадлежность 33 групп сальмонелл, чаще выделяемых из патматериала, из продуктов животного происхождения и объектов внешней среды.

Сыворотки выпускаются двумя наборами. В набор № 1 входят О-комплексные сыворотки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В набор № 2 входят О- и Н-монорецепторные сыворотки (табл. 13).

Методика: вначале подготовленные чистые культуры испытывают с О-комплексными сыворотками. При этом РА на стекле ставят с каждой из О-комплексных сывороток последовательно, начиная с сыворотки № 1 и до получения положительных реакций с двумя сыворотками.

Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю О-комплексной сыворотки. В каждую каплю сыворотки вносят часть изучаемой культуры снятой с агара колонии, которую, тщательно растирая до гомогенного состояния, соединяют с каплей сыворотки. Если сыворотка и бактериальная культура друг другу специфичны, то через 2–3 мин происходит агглютинация бактериальных клеток — бактерии склеиваются *в виде мелких комочков*, реакционная жидкость при этом просветляется. По ре-

Таблица 13

Состав наборов сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сывороток для идентификации сальмонелл в РА на стекле (по Костенко Т. С.)

Набор № 1		Набор № 2		
Номер О-комплексных сывороток	Рецепторный состав комплексных сывороток	Монорецепторные сыворотки		
		О	Н	
		—	1-я фаза	2-я фаза
1	4, 7, 8, 9, 10, 15, 19	6	I m	e, n, x
2	4, 11, 16, 17, 18, 21, 28	14	c t	2
3	7, 11, 30, 35, 38, 39, 40	46	r p	5
4	8, 16, 30, 41, 42, 43, 44	34	e h	6
5	9, 17, 35, 41, 45, 47, 48	20	I v	(1, 2, 5, 6)
6	10, 18, 38, 42, 45, 50, 52	—	d	—
7	15, 21, 39, 43, 47, 50, 53	—	b	—
8	19, 23, 40, 44, 48, 52, 53	—	g	—

зультатам РА с О-комплексными сыворотками устанавливают О-групповую (серогрупповую) принадлежность сальмонелл.

Далее для определения серовариантной принадлежности сальмонеллы, отнесенные к определенной О-группе, испытывают с Н-монорецепторными сыворотками 1-й и 2-й фазы. В выборе сывороток для реакции исходят из антигенной структуры сальмонелл той группы, к которой отнесена определяемая культура, с учетом вида животных, от которого она выделена.

Техника постановки РА аналогична таковой при использовании О-комплексных и монорецепторных сывороток. Только Н-агглютинат имеет вид крупных, легко разбивающихся хлопьев при полном или частичном просветлении капли.

Одновременно с РА исследуемый материал засевают на трехсахарный агар Олькеницкого с мочевиной (глюкоза, лактоза, сахароза). Пробирки со средой скашивают так, чтобы на дне остался столбик агара высотой не менее 3 см (готовая среда желтого цвета). Посев на трехсахарный агар делают сначала штрихом по скошенной поверхности, а затем уколом в глубину столбика. Культуру выращивают при 37°C в течение 16–18 ч. При наличии сальмонелл желтый цвет среды изменяется следующим образом: столбик становится розовым, скошенная поверхность цвет не изменяет. Образование газа определяют по наличию трещин и разрыву столбика агара, сероводорода — по почернению столбика.

Сальмонеллы, не образующие сероводород, не изменяют цвет питательной среды. Бактерии, не относящиеся к сальмонеллам, расщепляющие мочевину, окрашивают столбик и скошенную поверхность в ярко-красный цвет, а бактерии, сбраживающие лактозу и сахарозу, изменяют цвет среды в синий.

Если культуры ферментируют лактозу с образованием газа и расщепляют мочевину, они не принадлежат к бактериям рода сальмонелла.

К бактериям из рода сальмонелла относятся не ферментирующие лактозу, сахарозу и ферментирующие глюкозу и маннит (*S. typhi suis* не ферментирует маннит), образующие сероводород (*S. cholerae suis* и *S. typhi suis* сероводород не образуют) и не образующие индол.

Выявление сальмонелл прямым методом иммунофлуоресценции. Обнаружение в патологическом материале сальмонелл, входящих в серологические группы В, С₁, С₂, D₁ и E₁, возможно

прямым методом иммунофлуоресценции с помощью комплексной и групповых сальмонеллезных флуоресцирующих сывороток.

Комплексная сыворотка применяется для обнаружения сальмонелл, входящих в любую из серогрупп В, С₁, С₂, D₁ или E₁. Групповые адсорбированные сыворотки применяют для определения принадлежности выявленных сальмонелл к одной из указанных групп.

Методика: из колоний, характерных для сальмонелл, или непосредственно из патологического материала готовят препараты, фиксируют химическим методом и на каждый мазок наносят по две капли флуоресцирующей сыворотки, разведенной по инструкции до рабочего разведения. Препараты помещают во влажную камеру, реакция продолжается 20 мин. Затем препараты в течение 5 мин обильно промывают физраствором, дополнительно — дистиллированной водой и подсушивают.

После этого на мазок наносят нефлуоресцирующее масло, просматривают под люминесцентным микроскопом при увеличении 5×90 и силе тока 4,1 А.

Сальмонеллы, окрашенные флуоресцирующей сывороткой, имеют светящийся периферический контур, это специфическое свечение визуально оценивают от «++++» до «+». Диагностически положительным считается свечение не менее чем на «++», при условии, что в контрольных препаратах, окрашенных гетерологической сывороткой, свечение отсутствует.

Идентификация изучаемых сальмонелл также может быть проведена с помощью сальмонеллезного бактериофага, реакция с которым всегда высокоспецифична.

Методика: на поверхность подсушенного МПА в чашке Петри наносят две капли взвеси молодой изучаемой культуры сальмонелл. Тонко оттянутой пастеркой на одну из капель наносят O-бактериофаг, на контрольную — каплю бульона (перед работой ампулу с бактериофагом разводят по инструкции). Чашку с нанесенными культурами и O-бактериофагом ставят в термостат, через сутки учитывают результаты. Положительным результатом считают появление на месте внесения фага четко очерченной зоны лизиса с оценкой «++++», при наличии отдельных негативных колоний, в зависимости от их количества, реакцию оценивают на «++++», «++» или «+».

При отрицательном результате — отсутствие негативных колоний в местах нанесения О-бактериофага — будет сплошной рост нанесенной культуры, как и в контрольной капле.

Обнаружение подвижных (*кроме S. pullorum и S. gallinarum*) палочек, отрицательных по Граму, не ферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не образующих индол, образующих H_2S , не разжижающих МПЖ, не расщепляющих мочевины, растущих на среде Симмонса (усваивающих цитратно-аммонийные соли), дающих отрицательную реакцию Фогес — Проскауэра и положительную пробу с метиловым красным, дающих положительную РА с диагностическими О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, указывает на присутствие бактерий из рода сальмонелла.

Если культура обладает ферментативными свойствами, типичными для сальмонелл, но не агглютинируется сальмонеллезными О- и Н-сыворотками, ее следует направить в Государственный институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

План работы.

1. Изучить культуральные свойства сальмонелл на МПА и МПБ в пробирках.
2. Приготовить препарат из агаровой культуры сальмонелл, окрасить по Граму и изучить под иммерсионным объективом.
3. Изучить биохимические свойства сальмонелл, провести биохимическую дифференциацию от культуры кишечной палочки на коротком пестром ряду (среды Гисса), агаре Эндо.
4. Провести серологическую идентификацию сальмонелл в РА на предметном стекле с применением О-комплексных и Н-монопепторных агглютинирующих сальмонеллезных сывороток.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На чем основана дифференциация сальмонелл от кишечной палочки на агаре Эндо?
2. С какой целью применяются среды обогащения при выделении сальмонелл?
3. На чем основана серологическая идентификация сальмонелл?
4. Какие компоненты добавляют в элективные питательные среды при выделении сальмонелл?

ТЕМА 19

Индикация возбудителя туберкулеза

Цель занятия: изучить методы индикации возбудителя туберкулеза в исследуемом материале; ознакомиться с морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами возбудителя туберкулеза.

Материальное обеспечение: посевы возбудителя туберкулеза в пробирках с селективными средами; стереомикроскоп для изучения культуральных свойств; набор красок по Граму, по Цилю — Нильсену; спиртовки; бактериологические петли; предметные стекла; таблица «Схема бактериологической диагностики».

Возбудителями являются бактерии рода *Mycobacterium*, семейства *Mycobacteriaceae*. К возбудителям, имеющим значение в инфекционной патологии, относят возбудителя туберкулеза человека (*Myc. tuberculosis*), крупного рогатого скота (*Myc. bovis*) и птиц (*Myc. avium*).

Лабораторная диагностика туберкулеза.

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

Материалом для исследования служат лимфатические узлы — заглочные, подчелюстные, бронхиальные, брыжеечные, печеночные, надвыменные, а также кусочки легких, пе-

чени и селезенки. Для прижизненной диагностики от исследуемых животных в лабораторию направляют пробы молока и спермы.

Обсемененность исследуемого материала возбудителем может быть незначительной, поэтому специальными методами обработки повышают концентрацию возбудителя и уничтожают сопутствующую микрофлору.

Для освобождения от посторонней, сопутствующей микрофлоры измельченный исследуемый материал, содержащий кислотоустойчивые микобактерии, растирают в ступке, заливают 6%-ным раствором серной кислоты на 10–20 мин в соотношении 1:4. Затем фильтруют от крупных частиц, центрифугируют, отмывают от кислоты и нейтрализуют 15%-ным раствором двууглекислой соды. Осадок суспендируют в небольшом количестве физраствора и используют для посева и приготовления мазков для микроскопии.

Для концентрации микобактерий в исследуемом материале применяют метод флотации. Для этого материал гомогенизируют в физрастворе и 10 мл гомогената вносят в колбу с узким горлом на 250 мл, добавляют 10 мл 1%-ного раствора гидроксида натрия. Колбу встряхивают в течение 10 мин, содержимое разбавляют в соотношении 1:10 дистиллированной водой, вносят 1–2 мл ксилола, смесь вновь встряхивают в течение 5–10 мин, добавляют дистиллированную воду до горлышка колбы и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Микобактерии концентрируются во флотационном кольце у горлышка колбы вместе с каплями ксилола, которые, всплывая на поверхность, увлекают за собой и микобактерии. Содержимое кольца используют для посева в питательные среды и приготовления мазков на предметном стекле.

Для прямого обнаружения микобактерий в нативном материале можно применить окрашивание раствором флуорохромов с последующей микроскопией под люминесцентным микроскопом.

Методика окрашивания по Цилю — Нильсену: микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов, миколовой кислоты, поэтому с трудом воспринимают анилиновые красители. Их окрашивание достигается при применении концентрированного основного фуксина Циля.

1. Готовят мазок на предметном стекле из исследуемого материала; высушивают на воздухе и фиксируют химическим или физическим методом.

2. На мазок кладут кусочек белой фильтровальной бумаги (2×2 см), на который наносят основной карболовый фуксин Циля и в течение 5–7 мин красят при подогревании; краску необходимо доливать по мере испарения (при этом в красный цвет окрашиваются как туберкулезные палочки, так и сопутствующая микрофлора); бумагу сбрасывают.

3. Для обесцвечивания наносят 5% -ный раствор серной кислоты на 1–3 с (очень важный момент дифференциации кислотоустойчивых бактерий, поэтому заранее надо оттитровать время обесцвечивания посторонней микрофлоры, так чтобы туберкулезные палочки не успели обесцветиться).

4. Тщательно промывают водой.

5. Докрашивают посторонние бактерии метиленовой синью 3–5 мин.

6. Промывают водой.

Микрокартина: кислотоустойчивые туберкулезные палочки красного цвета, сопутствующая микрофлора — синяя.

При дифференциации микобактерий учитывают морфологические, культуральные, ферментативные и патогенные свойства.

В препаратах *Myc. tuberculosis* имеет вид тонких прямых или слегка изогнутых палочек, расположенных беспорядочно или в виде определенных скоплений, *Myc. bovis* — короткие и грубые палочки, *Myc. avium* — самые полиморфные, могут быть палочковидные, нитевидные и даже кокковидные.

Лучшие результаты для индикации возбудителя туберкулеза дает применение *люминесцентного метода* микроскопии. Для обнаружения возбудителя туберкулеза препарат обрабатывают растворами флуорохромов с последующим изучением препарата в люминесцентном микроскопе. Данный метод позволяет обнаружить даже незначительное количество микобактерий в препарате, которые на темном фоне видны как светящиеся желто-зеленые палочки.

Для молекулярных методов индикации возбудителя туберкулеза фирма «Нарвак» выпускает тест-систему для идентификации и дифференциации *M. bovis*, *M. tuberculosis* в ПЦР.

Выделение чистой культуры и ее идентификация: микобактерии туберкулеза — строгие аэробы, температурный оптимум — 37–38°C при рН 6,4–7,0. Для них характерен медленный обмен веществ, что приводит к замедленному росту на питательных средах.

Перед посевом исследуемый материал подготавливают, как указано выше, делают посев одновременно в 5–10 пробирок с плотной средой. Посевы регулярно просматривают, пробирки с ростом посторонних микроорганизмов выбраковывают. Через неделю пробки парафинируют и выдерживают до 3 мес. Для выделения культур применяют многокомпонентные, сложные по составу питательные среды со стимуляторами роста — Гельберга, Петраньяни и др. (в состав последней входят молоко, картофельный крахмал, пептон, картофель, яйца, глицерин, водный раствор малахитовой зелени).

Myc. tuberculosis на плотных питательных средах образует рост в виде сухого морщинистого налета кремового цвета, в глицериновом МПБ на 15–30 день появляется сухая морщинистая пленка, поднимающаяся по стенкам колбы, которая постепенно утолщается, среда остается прозрачной.

На плотных питательных средах первичный рост *Myc. bovis* появляется на 20–60 сут. в виде морщинистого налета, на котором образуются бородавчатые колонии кремового цвета; на жидких питательных средах образует тонкую морщинистую пленку, при этом среда остается прозрачной.

На плотных питательных средах на 15–30 сут. при первичном посеве *Myc. avium* образует сливающиеся бугристые, иногда слизистые колонии. В жидких питательных средах чаще образует как поверхностный (в виде морщинистой бугристой пленки), так и придонный рост.

Для изучения ферментативных свойств микобактерий целесообразно применять безбелковые синтетические среды Сотона, Моделя.

Биопроба: заражение лабораторных животных проводят для дифференциации отдельных видов микобактерий параллельно с изучением морфологических и культуральных свойств возбудителя. Данный метод основан на разной чувствительности морских свинок и кроликов к различным видам микобактерий. Так, *M. bovis* патогенен для морских свинок и кроликов,

M. tuberculosis — лишь для морских свинок, а *M. avium* — для кроликов и птиц.

При появлении клинических признаков заболевания лабораторных животных подвергают убою с последующим патологоанатомическим исследованием и приготовлением из пораженных органов мазков, которые окрашивают по методу Циля — Нильсена. При наличии в них характерных микобактерий подтверждают положительный диагноз на туберкулез, и биопробу прекращают.

Серологическая диагностика: постановку РСК рекомендуют как дополнительный метод при отборе для диагностического уоя животных, положительно реагирующих на туберкулин.

План работы.

1. Изучить культуральные свойства вакцинного штамма возбудителя туберкулеза на среде Петраньяни.
2. Приготовить препарат из вакцинного штамма возбудителя туберкулеза, специально загрязненного посторонней микрофлорой, и окрасить по Цилю — Нильсену. Микрокартину изучить и зарисовать. Обратит внимание на дифференциацию возбудителя туберкулеза от посторонней микрофлоры.
3. Провести микроскопию демонстрационного препарата на туберкулез под люминесцентным микроскопом.
4. Ознакомиться с биопрепаратами для профилактики и диагностики туберкулеза.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На чем основывается суть окраски по Цилю — Нильсену?
2. Какие питательные среды применяют для культивирования возбудителя туберкулеза? Какие компоненты обязательно входят в их состав?
3. Какой метод применяется для обработки исследуемого материала для освобождения от сопутствующей микрофлоры?

ТЕМА 20

Индикация возбудителя бруцеллеза

Цель занятия: изучить методы индикации возбудителя бруцеллеза в исследуемом материале; ознакомиться с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами возбудителя бруцеллеза.

Материальное обеспечение: посевы возбудителя бруцеллеза в пробирках с МППГГА и МППГГБ (мясопептонный печеночный глюкозо-глицериновый агар и бульон); стереомикроскоп для изучения культуральных свойств; набор красок по Граму, по Козловскому; спиртовки; бактериологические петли; предметные стекла; физиологический раствор; пипетки пастеровские, градуированные, автоматические; таблица «Схема бактериологической диагностики инфекционных болезней».

Необходимы компоненты для постановки пробирочной РА, для постановки роз-бенгал пробы, для постановки РСК, для постановки кольцевой реакции с молоком (для положительной пробы в молоко добавляют капли бруцеллезной сывотки).

Возбудителями бруцеллеза являются бактерии рода *Brucella*: *B. melitensis* — возбудитель бруцеллеза овец и коз; *B. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. suis* — возбудитель бруцеллеза свиней; *B. ovis* — возбудитель бруцеллеза овец; *B. neotomae* — возбудитель бруцеллеза крыс; *B. canis* — возбудитель бруцеллеза собак.

Лабораторная диагностика бруцеллеза.

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

Материалом для прижизненной диагностики являются абортированный плод с околоплодными оболочками; для серологического исследования направляют сыворотку крови, молоко. При убое животных отбирают паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов — семенники.

Микроскопическое исследование: из присланного материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают их по Граму и изучают морфологические свойства сальмонелл под микроскопом. *Brucella* представляют собой коккобактерии или мелкие палочки величиной 0,5–1,5 мкм, неподвижные, грамтрицательные, истинной капсулы не образуют. В препаратах располагаются одиночно, беспорядочно, редко парами.

Если исследуемый материал загрязнен посторонней микрофлорой, рекомендуется применить специальный метод окрашивания бруцелл по Козловскому, основанному на «феномене запаздывания» бруцелл к окрашиванию вторым красителем.

Методика окрашивания бруцелл по Козловскому.

1. На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу (2×2 см), на которую наносят 2% -ный водный раствор сафранина и окрашивают в течение 2 мин при подогревании (до кипения не доводить). Все бактерии (бруцеллы и посторонние) принимают цвет сафранина.

2. Краску смывают водой.

3. Дополнительно окрашивают 1% -ным водным раствором малахитовой зелени — 30–60 с. За это время успевают окраситься только посторонние бактерии, а у бруцелл наблюдается «феномен запаздывания» к окрашиванию вторым красителем, поэтому они остаются розовыми.

4. Краску смывают водой.

Микрокартина: бруцеллы ярко-розовые, а посторонняя микрофлора успевает окраситься в зеленый цвет.

Выделение чистой культуры и ее идентификация: возбудители *Brucella* по типу дыхания являются аэробами или микроаэрофилами, оптимальная температура культивирования — 37°C при pH 6,8–7,4. Для выращивания бруцелл применяют специальные среды: мясопептонный печеночно-глюкозный глицериновый бульон и агар с добавлением 1% глюкозы и 2–3% глицерина (МППГБ и МППГА); эритрит-агар, стимулирующий рост бруцелл; сывороточно-декстрозный агар с добавлением 10% сыворотки и 1% декстрозы. При подозрении загрязнения исследуемого материала сопутствующей микрофлорой его засевают на среды с ингибиторами (генцианвиолет 1:200 000, хлорескуиниловый натрий 0,25 мг/мл).

Микроаэрофильные свойства проявляют такие возбудители, как *B. abortus*, *B. ovis*, которые при первичном выделении из патматериала требуют повышенное содержание оксида углерода (до 10–12% CO₂), они растут медленно (до 30 дней), поэтому их рост контролируют и периодически просматривают посевы. Типичные штаммы бруцелл на поверхности агара образуют мелкие прозрачные S-формы колонии, которые по мере старения мутнеют (не исключается появление R-форм), в бульоне наблюдается равномерное помутнение и пристеночное кольцо, на дне — рыхлый осадок.

Для идентификации и дифференциации выделенных культур ставят большое количество тестов. Изучают потребность в оксиде углерода; способность расти на питательных средах в присутствии некоторых ингибиторов (анилиновые краски — тионин и фуксин); выделение сероводорода и образование индола (см. тему «Ферментативные свойства»); ферментацию углеводов; проверяют оксидазную и каталазную активность, подвижность, способность редуцировать нитраты, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, патогенность к лабораторным животным.

Определение потребности выделенных бруцелл в оксиде углерода проводится по следующей методике: часть пробирок с посевами помещают в эксикатор, в который через газомер вводят CO₂ до содержания 5–10%, эксикатор ставят в термостат и культивируют при 37°C. Одновременно другую часть посевов для контроля культивируют в обычных условиях, полученные посевы сравнивают и анализируют. Дело осложняется тем, что

некоторые биовары *B. abortus* могут вырасти и без повышенного содержания CO_2 .

Определение способности расти на питательных средах в присутствии некоторых ингибиторов: готовят питательные среды с анилиновыми красками в определенной концентрации — тионин (1:25000) и фуксин (1:50000). Так, культуры *B. abortus* и *B. melitensis* не растут на среде, содержащей тионин, а *B. ovis* растет на средах и с тионином и с фуксином.

Для выявления бруцелл непосредственно в патологическом материале, а также в объектах окружающей среды, предложен прямой метод иммунофлуоресценции; непрямой метод позволяет обнаружить антитела в сыворотке больных, переболевших или вакцинированных животных.

Определение чувствительности к фагам проводят по следующей методике: делают посев изучаемых бруцелл на поверхность питательной среды в чашке Петри сплошным газоном и на посев наносят капли фага на определенном расстоянии друг от друга, чашки на сутки ставят в термостат при 37°C. В положительном случае появляются прозрачные зоны.

Для окончательной идентификации выделенных бруцелл ставят РА с диагностическими агглютинирующими R- и S-сыворотками.

Методика: на предметное стекло наносят капли R- и S-сывороток и каплю физраствора, в них суспендируют выделенную культуру. Если исследуемая культура даст положительную РА («++» и более) с обеими или с одной из диагностических сывороток и отрицательную реакцию с физраствором, то ее относят к виду *Brucella*. Для контроля R-сыворотки проверяют в разведении, указанном биофабрикой, с роз-бенгал и цветными антигенами; S-сыворотки — в титре, указанном на упаковке с цветным антигеном и в неразведенном виде с роз-бенгал антигеном.

Для обнаружения бруцелл в патологическом материале, обильно обсемененном посторонней микрофлорой, проводят биопробу на восприимчивых морских свинках, которым подкожно вводят 1 мл суспензии (1:10) из исследуемого материала. У морских свинок бруцеллез протекает хронически, поэтому у них берут кровь на 15, 25, и 40-й день, в сыворотке которой в РА определяют наличие антител. Положительная РА в

разведении 1:10 и выше свидетельствует о заражении бруцеллезом, далее для выделения чистой культуры бруцелл морских свинок умерщвляют, делают посевы из лимфоузлов, селезенки, печени и костного мозга.

Культуры бактерий, обладающие типичными морфологическими, тинкториальными, культуральными, ферментативными свойствами и давшие положительную РА с позитивной бруцеллезной сывороткой, относят к бруцеллам.

С помощью *роз-бенгал пробы (РПБ)* исследуют большое количество животных в сжатые сроки. РБП относится к *качественным реакциям*, так как с ее помощью можно выявить наличие антител в сыворотке крови больного животного, но нельзя определить их титр. Сыворотки, давшие положительную РБП, дополнительно исследуются в пробирочной РА и РСК.

Методика постановки РБП: на предметное стекло наносят 0,3 мл исследуемой сыворотки крови животного и 0,03 мл бруцеллезного антигена (это компонент биофабричного изготовления с этикеткой, представляет собой взвесь бруцелл, окрашенных розовым бенгальским). Осторожным покачиванием стекла компоненты перемешивают и через 3–5 мин учитывают результат. В положительном случае появляются розовые комочки агглютината.

Кольцевая реакция с молоком (КР) относится к ориентировочным, ее применяют для проверки благополучных по бруцеллезу молочных стад и для контроля молока на рынке.

Методика постановки КР: в бактериологические пробирки наливают по 2 мл исследуемого молока, добавляют 0,1 мл антигена (взвесь бруцелл, окрашенных гематоксилином). Пробирки встряхивают и помещают в водяную баню при 37°C на 45 мин, содержимое окрашивается в фиолетовый цвет. В положительном случае бруцеллы агглютинируют и адсорбируются на капельках жира, который, поднимаясь вверх, окрашивает тонкий слой сливок в фиолетовый цвет, само молоко становится белым. В отрицательном случае, когда нет антител в молоке, неокрашенные сливки поднимаются вверх, образуют белое кольцо, а само молоко остается равномерно окрашенным в фиолетовый цвет. В сомнительном случае слой сливок слабо окрашен, столбик молока приобретает фиолетовый цвет.

Серологическая диагностика: при массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, роз-бенгал пробу (РБП на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР).

Пробирочную реакцию агглютинации ставят в объеме 1 мл. Сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, собак, пушных зверей, верблюдов разводят 0,5%-ным фенолизированным физиологическим раствором; сыворотки крови овец, коз, буйволов разводят 5,0%-ным, а сыворотки оленей — 10%-ным фенолизированным физиологическим раствором. Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов исследуют в разведениях от 1:50 до 1:400; овец, коз, свиней, буйволов, оленей и собак — в разведениях 1:25 и более; пушных зверей — 1:10 и более. При массовых исследованиях сыворотки крови ограничиваются постановкой РА в двух первых разведениях. После приготовления нужных разведений сыворотки в объеме 0,5 мл в каждую пробирку добавляют 0,5 мл разведенного до концентрации клеток $5 \cdot 10^8$ мл единого бруцеллезного антигена (при этом надо учитывать, что степень разведения исследуемой сыворотки в пробирке удваивается), компоненты перемешивают осторожным встряхиванием, штатив с пробирками ставят в термостат при 37°C на 18–20 ч, затем оставляют на несколько часов при комнатной температуре. Результат учитывают по общепринятой системе. В качестве контрольной параллельно ставят реакцию с заведомо положительной и отрицательной сывороткой (это эталон положительной и отрицательной РА).

РА при бруцеллезе крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов считают положительной, если титр составляет 1:100 и более (1:50 сомнительный результат), у овец, коз, оленей, буйволов и собак — 1:50 (1:25 сомнительный результат). При получении сомнительных результатов у этих животных через 3–4 недели повторно берут кровь и с сывороткой вновь ставят РА. Обычно в ходе массовых серологических исследований ограничиваются постановкой реакции от каждого животного в первых двух разведениях.

Реакцию связывания комплемента (РСК) ставят в объеме 1 мл. Предварительно инактивированные в течение 30 мин сыворотки крови (лошадей — при 56–58°C; крупного рогатого ско-

та и свиней — при 60–62°C, овец и коз — при 58–60°C) исследуют в разведении 1:5–1:10. Положительным результатом РСК (РДСК) считают задержку гемолиза на «++» и более в разведении сыворотки крови 1:5.

План работы.

1. Изучить морфологические и культуральные свойства вакцинного штамма возбудителя бруцеллеза на МППГБ и МППГА.

2. Приготовить препарат из культуры вакцинного штамма бруцеллеза на предметном стекле; окрасить по Граму; провести микроскопию.

3. Приготовить препарат из вакцинного штамма возбудителя бруцеллеза, специально загрязненного посторонней микрофлорой, и окрасить по Козловскому. Провести микроскопию, обратить внимание на дифференциацию возбудителя от посторонней микрофлоры. Препарат изучить и зарисовать.

4. Поставить роз-бенгал пробу — РА на стекле; оценить картину положительной и отрицательной реакции, их отличие.

5. Поставить кольцевую реакцию с молоком, оценить положительную реакцию, объяснить наличие окрашенного кольца.

6. Ознакомиться с результатами готовой пробирочной РА, встряхнуть осадок-агглютинат, описать картину положительной и отрицательной реакции.

7. Познакомиться с биопрепаратами, применяемыми для профилактики бруцеллеза.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На каком свойстве бруцелл основана окраска по Козловскому?
2. Какие питательные среды применяют при культивировании возбудителя бруцеллеза?
3. Перечислите все серологические методы диагностики бруцеллеза.
4. В каких случаях применяется кольцевая реакция с молоком?
5. Почему РВП относится к качественным реакциям?

ТЕМА 21

Индикация возбудителя сибирской язвы

Цель занятия: ознакомиться с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами возбудителя сибирской язвы; изучить методы индикации возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале.

Материальное обеспечение: посевы вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы в пробирках с МПА и МПБ, в чашках Петри с изолированными колониями; стереомикроскоп для изучения культуральных свойств; набор красок по Граму, Ольту, Михину; спиртовки; бактериологические петли; предметные стекла; набор реактивов для постановки теста «жемчужное ожерелье», для определения чувствительности к пенициллину и бактериофагу; готовый препарат на предметном стекле из патматериала для демонстрации капсул возбудителя сибирской язвы; компоненты для постановки РП; таблицы «Окраска капсул», «Схема бакдиагностики».

Возбудитель сибирской язвы — бактерия *Bacillus anthracis*, род *Bacillus*.

Bacillus anthracis является типичным представителем патогенных бацилл, относится к семейству *Bacillaceae* и роду *Bacillus*.

Лабораторная диагностика сибирской язвы.

Лабораторная диагностика сибирской язвы состоит из обнаружения возбудителя в исследуемом материале методами световой и люминесцентной микроскопии; выделения чистой куль-

туры; идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным и патогенным свойствам. При подозрении на сибирскую язву категорически запрещается вскрывать трупы павших животных, поэтому материалом для лабораторного исследования является ухо павшего животного, на которое с особыми мерами предосторожности накладывают две лигатуры, а место среза прижигают. Исследуемый материал помещают во влагонепроницаемую тару, пломбируют, указывают верх тары, оформляют сопроводительный документ и направляют в лабораторию.

Микроскопическое исследование: в лаборатории из крови уха готовят мазок, окрашивают по Граму, капсулы — по Ольту (или Михину), а также обрабатывают сибиреязвенными люминесцирующими сыворотками. В препаратах, окрашенных по Граму, видны крупные грамположительные палочки (6–10 мкм), соединенные в короткие цепочки. В препаратах, окрашенных по Ольту или Михину, концы палочек, обращенных друг к другу, резко обрублены и слегка втянуты, свободные концы закругленные, клетки окружены общей капсулой, что является важным диагностическим признаком.

Микрокартина настолько специфична, что предварительный ответ дают немедленно по результатам исследования.

Для выделения чистой культуры возбудителя, который является факультативным анаэробом, исследуемый материал вносят в МПБ и МПА (рН 7,2–7,4) и выдерживают 24 ч в термостате при 37°C. Выросшие культуры просматривают, изучают культуральные свойства. Типичные для *B. anthracis* крупные, серо-белые колонии R-формы, края которых под малым увеличением имеют вид завитков, получивших название «львиная грива». В препаратах, приготовленных из агаровой бактериальной культуры, бактерии располагаются в виде длинных цепочек. МПБ остается прозрачный, на дне появляется хлопьевидный осадок. По мере старения бактерий, при накоплении продуктов метаболизма в культуральной жидкости, возбудитель сибирской язвы образует споры (бациллы), располагающиеся в центре палочки. Они не образуются при температуре ниже 12°C и выше 42°C, а также в живом организме или не вскрытом трупе.

Для выделения чистой культуры возбудителя сибирской язвы из исследуемого материала, загрязненного посторонней микрофлорой, делают посев в *селективные среды*, в состав которых вводят 200–500 ЕД/мл полимиксина в сочетании с триметопримом, которые подавляют рост *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* и др.

При появлении сомнительных данных в результате бактериологических исследований применяют дополнительные тесты с целью дифференциации выделенной культуры от сходных сапрофитных бацилл (например, *B. cereus*). При этом определяют способность выделенного возбудителя к капсулообразованию путем посева на сыровоточные среды, патогенность для лабораторных животных, чувствительность к пенициллину и бактериофагу, гемолитическую активность, специфичность к сибиреязвенным люминесцирующим сывороткам.

Для дифференциации выделенной культуры от сапрофитов ставят тест «Жемчужное ожерелье». Для чего готовят ряд последовательных разведений пенициллина и три колбочки с 20 мл расплавленного и охлажденного до 50°С МПА. В первую колбу вносят 10 ЕД пенициллина, получают агар, содержащий 0,5 ЕД/мл; во вторую колбу вносят 1 ЕД пенициллина и получают агар с 0,05 ЕД/мл пенициллина; третью колбочку оставляют без пенициллина для контроля. Содержимое всех трех колбочек разливают в стерильные пробирки по 5 мл в каждую и скашивают. Во все пробирки вносят по 0,25 мл 3-часовой исследуемой бульонной культуры. Посевы помещают в термостат при 37°С в наклонном положении, так чтобы бульонная культура распределилась по всей поверхности ко-го агара.

Через три часа из конденсационной жидкости пробирок берут каплю материала, делают мазок, высушивают на воздухе, фиксируют химическим методом и окрашивают простым методом или по Граму. *Под воздействием пенициллина только палочки сибирской язвы изменяются и приобретают шаровидную форму, появляется сходство с ожерельем из бус*, поэтому при микроскопии такой культуры будут видны цепочки из шарообразных форм — феномен «Жемчужное ожерелье».

Споровые сапрофитные аэробы (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*), как правило, не образуют шарообразные формы, а сохраняют обычную форму палочек, т. е. дают отрицательный ответ при постановке этого теста.

Для определения чувствительности выделенной культуры к сибиреязвенному бактериофагу ее засевают «методом газона» на поверхность МПА в чашке Петри. Затем на поверхность засеянной среды наносят каплю бактериофага в рабочем титре, дают ей стечь в виде дорожки, посеvy выдерживают в течение 24 ч в термостате при 37°C. В случае принадлежности исследуемой культуры к *B. anthracis*, в зоне нанесения бактериофага остается стерильная (вернее, прозрачная) полоса, при наличии роста культуры во всей чашке.

Иммунофлуоресцентный тест: флуоресцирующую адсорбированную сыворотку, не дающую перекрестных реакций с антигенно-родственными сапрофитными бациллами, применяют для идентификации выделенного возбудителя методом флуоресцирующих антител.

Определение способности выделенной культуры образовывать капсулу в условиях in vitro: на обычных питательных средах возбудитель сибирской язвы не образует капсулу, но при добавлении сыворотки крови в питательную среду (например, в среде ГКИ) культура формирует капсулу.

Для проведения пробы готовят питательную среду ГКИ (к 60 мл раствора Хенкса добавляют 40 мл инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота, раствором двууглекислого натрия устанавливают рН 7,2) и разливают по 2 мл в пробирки, которые закрывают резиновыми пробками. Исследуемую культуру петлей вносят в пробирку со средой ГКИ, ставят в термостат при 37°C, результаты контролируют микроскопией. Через 60–120 мин у отдельных сибиреязвенных палочек начинается капсулообразование, а через 16–18 ч большинство из них образует капсулу.

Гемолитическую способность изучают посевом выделенной культуры на кровяном МПА в чашках Петри. Возбудитель сибирской язвы, в отличие от сапрофитов (*B. cereus*), не обладает гемолитическими свойствами, что является дифференцирующим признаком от сапрофитов.

Если для исследования поступил загнивший материал, из которого нельзя выделить чистую культуру сибирской язвы, то в нем определяют наличие специфических антигенов при помощи реакции кольцепреципитации. Для этого материал экстрагируют в течение 30–40 мин «горячим способом», т. е. кипячением в физиологическом растворе (в соотношении 1:10). Полученный экстракт фильтруют через асбестовую вату и исследуют по обычной методике в РП.

Биопроба: для постановки биопробы на животных, часть исследуемого материала растирают в ступке с небольшим количеством физиологического раствора. Двум белым мышам вводят 0,2–0,5 мл гомогената под кожу в области спины. Наблюдение ведут в течение 10 дней, в случае гибели мышей их вскрывают: из крови сердца, печени, селезенки и места заражения готовят мазки, а из органов делают посевы для выделения чистой культуры.

Основанием для постановки диагноза на сибирскую язву является: наличие в мазках из патологического материала капсулообразующих бактерий, а в препаратах из колоний — грамположительных, неподвижных бацилл; на питательных средах — характерный рост; чувствительность к пенициллину и бактериофагу, положительный тест в РП и положительный результат биологической пробы.

План работы.

1. Изучить культуральные свойства возбудителя сибирской язвы на МПА и МПБ в пробирках и изолированных колоний на МПА в чашках Петри с применением стереомикроскопа, обратить внимание на характерные колонии.

2. Приготовить препарат из агаровой культуры вакцинного штамма сибирской язвы. Окрасить по Граму; изучить под микроскопом морфологические и тинкториальные свойства возбудителя сибирской язвы.

3. Поставить РП методом наслаивания с биофабричными компонентами.

4. Ознакомиться с результатами демонстрационного посева спорных сапрофитных аэробов (*B. cereus*) на кровяном агаре.

5. Ознакомиться с результатами определения чувствительности выделенной культуры к пенициллину и сибиреязвенному бактериофагу.

6. Ознакомиться с вакцинами, гипериммунными сыворотками и диагностическими препаратами.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Особенности схемы бактериологической диагностики сибирской язвы.
2. Какие морфологические особенности возбудителя сибирской язвы отличают его от других микроорганизмов?
3. Какие культуральные особенности у возбудителя сибирской язвы?
4. Почему нужно соблюдать меры предосторожности при работе с патматериалом, который содержит возбудителя сибирской язвы?
5. Обладает ли возбудитель сибирской язвы гемолитическими свойствами?

ТЕМА 22

Индикация патогенных кокков

Цель занятия: ознакомиться с морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами патогенных кокков — стафилококков и стрептококков; изучить методы индикации возбудителей стафилококкозов и стрептококкозов в исследуемом материале.

Материальное обеспечение: посевы культур стафилококка и стрептококка в пробирках с МПА и МПБ, в чашках Петри с изолированными колониями для изучения культуральных свойств с помощью стереомикроскопа; чашки Петри для демонстрации метода диффузии в агар при определении чувствительности бактерий к антибиотикам; для демонстрации: кровяной агар — колонии с гемолизом, желточно-солевой агар с положительной лецитовителлазной пробой, оценить реакцию плазмокоагуляции (свернувшаяся плазма не должна выливаться из пробирки); готовые препараты с мытным стрептококком и возбудителем диплококковой септицемии; набор красок по Граму; метиленовая синь; спиртовки; предметные стекла; бактериологические петли; готовые препараты из патматериала при диплококковой септицемии, гноя и чистой культуры стафилококка и стрептококка для демонстрации; таблица «Схема бакдиагностики при патогенных кокках».

К патогенным коккам относятся бактерии рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* (*Diplococcus*). Все они способны вызывать нагноительные процессы кожи и подкожной клетчатки, проте-

кающие локализованно или принимающие генерализованный характер (пиемия, сепсис), диплококковая септицемия молодняка сельскохозяйственных животных.

Лабораторная диагностика стафилококкозов.

Стафилококкозы вызывают бактерии рода *Staphylococcus* из семейства *Micrococcaceae*. Официально утверждены три вида: *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*. Стафилококки вызывают у человека и животных стафилококкозы, различные нагноительные процессы: фурункулы, карбункулы, маститы, гнойное воспаление ран, сепсис и септикопиемию; у коров получил распространение стафилококковый мастит. Токсигенные штаммы, попав в продукты питания, вызывают пищевые токсикозы.

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

Материалом для исследования служат раневой экссудат, гной из абсцессов, кровь при септицемии, молоко при маститах из пораженной доли и кусочки паренхиматозных органов.

Микроскопическое исследование: из исследуемого материала готовят препараты, окрашивают их метиленовой синью, а также по Граму, микроскопируют и изучают морфологические и тинкториальные свойства. В положительном случае обнаруживают грамположительные кокки диаметром 0,5–1,0 мкм, которые не образуют спор и капсул, располагаются единично, парами, в виде скоплений неправильной формы и гроздьев винограда.

Выделения чистой культуры и идентификации ее: стафилококки относятся к факультативным анаэробам. Они хорошо растут на обычных питательных средах при температуре 35–40°C, оптимум pH 7,2–7,4. На МПА они образуют мелкие колонии S-формы различной пигментации: белые, чаще желтые. На МПБ появляется обильное помутнение и рыхлый осадок.

Исследуемый материал, загрязненный сопутствующей микрофлорой, вносят в элективные среды: на солевой МПА с 8–10%

хлорида натрия (на нем сопутствующая микрофлора не растет); на молочно-солевой агар, который применяют для выделения стафилококков из исследуемого материала (гноя, молока), на котором стафилококки образуют выраженный пигмент; на среде Байрд — Паркера, где они растут в виде черных блестящих колоний, окруженных узкой белой каймой; на МПА с добавлением 3 мл 0,1% -ного раствора кристаллвиолета, на котором патогенные стафилококки образуют колонии фиолетового цвета.

После получения чистой культуры на МПА и МПБ изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства возбудителя, а также приступают к изучению признаков, свидетельствующих о патогенности выделенной культуры. Патогенные штаммы стафилококков ферментируют маннит, выделяют лецитиназу, бактериальные гемолизины, лизирующие эритроциты; выделяют плазмокоагулазу, благодаря которой облегчается персистенция бактерий в тканях и затрудняется их фагоцитоз; синтезируют фермент гиалуронидазу, фактор инвазивности, деполимеризующий межклеточное вещество.

Методика определения гемолизина: на поверхности кровяного агара делают посев изучаемой культуры штрихом и ставят в термостат на 24 ч. Если возбудитель выделяет гемолизин, он диффундирует в агар и вызывает лизис эритроцитов, вокруг изолированных колоний образуется *прозрачная зона* гемолиза.

Методика определения плазмокоагулазы: в пробирку с 0,5 мл цитратной плазмы крови кролика, разведенной физраствором (1:5), вносят петлю чистой суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при 37°C. Реакцию плазмокоагуляции предварительно учитывают через 3–4 ч, осторожно, не встряхивая пробирку. В сомнительных случаях пробирку оставляют в термостате для окончательного учета на 24 ч. Реакцию считают положительной, если плазма коагулирует в сгусток (реакцию оценивают по степени плотности сгустка от одного до четырех плюсов).

Методика определения гиалуронидазы: в качестве источника гиалуронового субстрата можно использовать бактериальную культуру *Pasteurella multocida* серовар А. На поверхность питательной среды в чашке Петри штрихом засевают культуру *P. multocida*. Затем рядом в виде сплошной линии засевают

культуру изучаемого стафилококка, у которого выявляют способность к синтезу гиалуронидазы. Чашки с посевами ставят в термостат при 37°C на 16–24 ч. Если исследуемый возбудитель стафилококкоза выделяет гиалуронидазу, то она диффундирует из колонии в толщу питательной среды и разрушает капсулу тест-микроба. Это явление можно обнаружить только при просмотре колоний пастерелл в падающем свете под определенным углом: колонии *P. multocida* вблизи стафилококка по размеру меньше остальных и в отличие от флуоресцирующих отдаленных колоний — серого цвета.

Методика определения лецитиназы: готовят желточно-солевой агар в чашках Петри; делают посев изучаемой культуры штрихом; сутки культивируют в термостате. Вокруг колоний патогенного стафилококка, выделяющего лецитиназу, появляется отчетливо видимый золотисто-радужный венчик, такое явление называют лецитовителлазной реакцией.

Для идентификации выделенного стафилококка, выявления источников и путей его распространения можно также применить международный стандартный набор из 23 типов бактериофагов, с помощью которого можно типировать до 60–80% изолятов.

Для рациональной терапии больных животных, в связи с появлением антибиотикоустойчивых штаммов, предварительно проводят определение чувствительности выделенного возбудителя к различным антибиотикам. Суть метода состоит в том, что чистую культуру стафилококка наносят методом газона на поверхность МПА в чашках Петри. По поверхности засеянного агара раскладывают 5–6 бумажных дисков, пропитанных различными антибиотиками. Чашки ставят в термостат, антибиотики диффундируют в агар, через 20–24 ч проводят учет результатов. Вокруг антибиотиков, к которым чувствительны изучаемые стафилококки, появляется зона задержки роста, диаметр которой измеряют. Для лечения рекомендуют те антибиотики, вокруг которых была самая большая зона задержки роста — 20–32 мм.

Биопробой можно определить способность *S. aureus* продуцировать энтеротоксин. Для выявления энтеротоксина проводят внутривенное заражение кошек фильтратом из бульонной культуры изучаемого стафилококка (2–3 мл/кг), в положительном

случае у кошек возникают симптомы гастроэнтерита, развиваются рвота и диарея.

В продуктах с наличием стафилококков и их токсинов органолептические изменения не происходят. Интоксикации стафилококкового происхождения связаны с накоплением в инфицированной пище энтеротоксина. Классическое проявление интоксикации человека отмечается, когда в 1 г продукта содержится 10^5 – 10^7 стафилококков, способных вырабатывать токсин, менее 1 мкг которого вызывает пищевую интоксикацию.

Лабораторная диагностика стрептококкозов.

Наибольшее значение в инфекционной патологии сельскохозяйственных животных имеют следующие виды стрептококкозов: *S. pneumonia* — возбудитель стрептококковой септицемии молодняка сельскохозяйственных животных; *S. agalactiae* и *S. disagalactia* — возбудители мастита крупного рогатого скота; *S. equi* — возбудитель мыта лошадей; *S. pyogenes* — возбудитель ряда заболеваний, преимущественно человека.

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

Материалом для исследования при мыте являются носовые истечения, содержимое абсцессов лимфатических узлов, для посмертной диагностики — кровь из сердца и кусочки паренхиматозных органов. При подозрении на диплококковую септицемию — кровь из сердца, селезенка, печень, костный мозг. При стрептококковых маститах исследуют молоко из последних порций.

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

препаратах из патматериала имеет некоторые особенности: у *S. pneumonia* (по старой номенклатуре *Diplococcus lanceolatus*) парные кокки с удлинением концевой части, окруженные капсулой, что отразилось в названии; *S. eque* в мазках из гноя имеют вид длинных цепочек, а в препаратах из агаровой культуры — цепочки короче, при этом сами кокки сплющены. *S. agalactiae* и *S. disagalactia* везде имеют вид обычных цепочек. Препарат из патологического материала лучше окрашивать по Романовскому — Гимза или метиленовой синью, что дает нежный цвет и позволяет увидеть капсулу.

Стрептококки представляют собой круглые или овальные грамположительные кокки диаметром 0,5–1,25 мкм; неподвижные; спор не образуют; располагаются парами или короткими цепочками в зависимости от вида возбудителя. Например, кокки возбудителя пневмонии и диплококковой септицемии в препаратах из патматериала располагаются парно и окружены четко видимой прозрачной капсулой. Мытный стрептококк в препаратах из гноя располагается в виде длинных цепочек из мелких сплюснутых кокков.

Выделение чистой культуры и ее идентификация: стрептококки относятся к факультативным анаэробам, оптимальная температура культивирования 37°C, pH 7,2–7,4. При культивировании требуют специальные среды, в которые добавляют 1% глюкозы, 5–10% стерильной инактивированной сыворотки крови кролика или барана. Многие из них обладают гемолитическими свойствами, в зависимости от способа разрушения эритроцитов стрептококки делят на три группы: бета-гемолитический тип, образующий прозрачную зону гемолиза, альфа-гемолитический тип, образующий зеленоватую зону гемолиза, и гамма-гемолитический тип, не вызывающий гемолиз эритроцитов.

При посеве на кровяном МПА *S. pneumonia* образует круглые полупрозрачные колонии с альфа-гемолизом, в МПБ — равномерное помутнение. *S. eque* растет в виде мелких росинчатых колоний S-формы с узкой зоной бета-гемолиза, в МПБ происходит легкое помутнение, и со временем на дне появляется осадок в виде крупинок. У *S. agalactiae* (*S. disagalactia*) на кровяном МПА появляются мелкие сероватые колонии с бета-гемолизом, при росте на МПБ бульон остается прозрачный,

а на дне образуется мелкозернистый осадок. *S. pyogenes* на кровяном МПА образует мелкие прозрачные S-формы колонии с зоной бета-гемолиза, в бульоне — равномерное помутнение, после которого он просветляется и на дне появляется зернистый осадок.

Для исключения стафилококковой и энтерококковой инфекции (род *Enterococcus*) выделенную культуру исследуют в нескольких направлениях. Характерной особенностью стрептококков является отсутствие каталазной активности: стафилококки образуют каталазу, стрептококки — нет. Для дифференциации *S. pyogenes* от энтерококков полученную культуру вносят в МПБ, содержащий 40% желчи крупного рогатого скота и в МПБ с 6,5% хлорида натрия. Энтерококки в отличие от гноеродных кокков растут на этих средах, что является дифференциальным признаком.

Также проверяют чувствительность выделенной культуры к желчи крупного рогатого скота. Для этого 0,5 мл исследуемой суточной бульонной культуры вносят в МПБ с 10% желчи и выдерживают в термостате 1 ч. Чувствительные стрептококки лизируются, а энтерококки устойчивы к желчи.

Для дифференциации *S. pneumoniae* от прочих стрептококков применяют тест чувствительности к оптохину, который угнетает рост практически всех выделенных возбудителей.

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

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

Серогрупповую принадлежность выделенной культуры определяют в РП, применяя стрептококковые преципитирующие сыворотки, выпускаемые биологической промышленностью. Исследуемую культуру выращивают в МПБ в течение 18 ч. Затем 7–9 мл культуры центрифугируют; надосадочную жидкость удаляют; к осадку добавляют 0,3–0,4 мл 0,2 N раствора соляной ки-

слоты; осадок суспендируют; взвесь прогревают в кипящей водяной бане 10 мин; охлаждают; добавляют каплю 0,04% -ного спиртового раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,2 N раствором гидроксида натрия. Жидкость приобретает бледно-розовый цвет, ее повторно центрифугируют и надосадочную жидкость, содержащую термостабильный полисахаридный антиген С, используют как антиген для постановки реакции кольцепреципитации. По классификации Р. Ленсфильда стрептококки на основании антигенных свойств полисахарида С можно отнести к той или иной серологической группе: А, В, С, D и т. д. *S. pneumoniae* не содержит групповой полисахарид, но является антигенно-гетерогенным видом, который дифференцируют на типы в РА.

Стрептококки можно быстро идентифицировать при обработке мазков-отпечатков моноклональными антителами, мечеными флуоресцеинами.

Биопроба: для изучения патогенных свойств выделенных культур проводят биопробу на молодых белых мышах. Для заражения используют свежевыделенную бульонную культуру, которую вводят внутрибрюшинно трем мышам по 0,5 мл. Культура считается патогенной при гибели двух мышей.

Таким образом, заключительный бактериологический диагноз основывается на учете морфологических, тинкториальных, культурально-ферментативных и патогенных свойств возбудителя, выделенного из патологического материала.

План работы.

1. Изучить культуральные свойства стафилококков, стрептококков, выросших на питательных средах в чашках Петри и в пробирках с сывороточным МПБ.

2. Приготовить препараты на предметном стекле из суточной культуры всех представленных стафилококков и стрептококков; окрасить по Граму; провести микроскопию. Обратит внимание на морфологические особенности всех перечисленных стрептококков и сравнить их (размеры, форма, наличие капсулы, взаиморасположение).

3. Изучить на демонстрационных посевах гемолитические свойства на кровяном агаре в чашках Петри; оценить лецитовителлазную пробу на желточно-солевом агаре, провести учет реакции плазмокоагуляции.

4. Ознакомиться с профилактическими, диагностическими биопрепаратами. Бактериологическое исследование включает обнаружение возбудителя в исследуемом материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по комплексу признаков.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие инфекционные болезни вызывают стафилококки и стрептококки?
2. Какие морфологические свойства характерны только для стафилококков и стрептококков?
3. Как изучают патогенные свойства стафилококков?
4. Какие элективные среды применяют при выделении стафилококков из исследуемого материала?

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Абортивный — приостанавливающий развитие какого-либо процесса; недоразвившийся.

Авидность — степень аффинитета, характеризующая интенсивность, полноту и прочность соединения антигенов и антител.

Авирулентный, невирулентный — отсутствие у возбудителя болезни способности вызывать инфекционный процесс в макроорганизме. (См. вирулентность.)

Агар (малайское желе) — продукт, получаемый из морских водорослей. Агар — полисахарид, растворяется в воде при 80–86°С, при охлаждении образует гель. Используют в качестве ингредиента полужидких и плотных питательных сред в микробиологии.

Агглютинация — склеивание и выпадение в осадок взвешенных клеток, обладающих агглютинабельными свойствами (бактерии, форменные элементы крови и др.), в результате склеивания их с антителами. Агглютинация специфична и широко применяется в иммунодиагностике инфекционных болезней.

Агглютинины — антитела, образующиеся в организме к определенным антигенам (агглютиногенам) и вступающие в реакцию с ними.

Агглютинирующая сыворотка содержит антитела-агглютинины, способные склеивать корпускулярные вещества (микробы, крупные вирусы),

содержащие специфические антигены. Агглютинирующую сыворотку получают от животных, иммунизированных против определенных инфекционных болезней. Ее применяют для лабораторной идентификации микробов, а также в иммунотерапии и пассивной иммунопрофилактике при инфекционных болезнях. (См. иммунная сыворотка.)

Агглютиногены — антигены, индуцирующие в организме синтез агглютининов (см.) и вступающие в реакцию с ними.

Агрессины — продукты жизнедеятельности патогенных микробов, ослабляющие защитные силы (фагоцитоз и бактериолиз) организма. Они способствуют размножению возбудителей инфекции.

Адаптация — процесс приспособления организмов к конкретным условиям окружающей среды, необходимый для сохранения данного биологического вида и продолжения его популяции. При адаптации могут возникать как временные ненаследственные, так и наследственные морфофизиологические изменения. Она может произойти в рамках как одного поколения (изменение фенотипа), так и нескольких поколений (изменение генотипа). Существенным фактором адаптации является естественный отбор.

Адсорбция — поверхностное поглощение, концентрирование и удержание газообразного или растворенного

вещества (адсорбата) на поверхности твердого тела (адсорбента). Процесс продолжается до тех пор, пока не наступает равновесие между молекулами, связанными с поверхностью адсорбента и освободившимися (десорбция).

Адьюванты — неспецифические вещества различного происхождения, вспомогательные средства, введенные в организм вместе с антигенами. Они стимулируют и пролонгируют иммуногенез. В качестве адьювантов используют гидроксид алюминия, алюмокалиевые квасцы, хлорид кальция, минеральные масла, сапонин, бактериальные полисахариды. Их применяют при изготовлении вакцин, получении гипериммунных сывороток и анатоксинов.

Активный участок антигена (эпитоп) — пространственное расположение аминокислотных остатков белка антигена, образующих на его поверхности участок, способный вступать во взаимодействие с комплементарным участком, активным центром специфического антитела или служить в качестве связывающей группы.

Активный центр антитела — участок молекулы иммуноглобулина, взаимодействующий только с комплементарным участком молекулы специфического антигена. Антитела имеют один, два и более активных центров.

Алиментарный — зависящий от питания (кормления), связанный с передачей возбудителя через корм и воду.

Аллергены — вещества, которые при попадании в организм изменяют его реакции или оказывают сенсибилизирующее действие. После первичного контакта с аллергенами организм приобретает сверхчувствительность к ним и при повторном контакте отвечает аллергической реакцией.

Аллергия — измененная реакция организма, повышенная чувствительность его к различным веществам (аллергенам). Основой аллергии является сенсибилизация организма после первичного контакта с аллергеном. В случае повторного контакта с аллергеном организм реагирует в зависимости от путей введения аллергена (интравенозное, внутримышечное, подкожное) общей или местной реакцией. Различают аллергию не-

медленного (анафилактический шок, сывороточная болезнь) и замедленного типов (инфекционная аллергия).

Анатоксин — токсин, утративший свою токсичность под воздействием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства, например столбнячный анатоксин, ботулинический анатоксин.

Анафилаксия — состояние сверхчувствительности организма, связанное со вторичным или повторным введением аллергена; вызывает реакцию гиперчувствительности немедленного типа (см. аллергия). Аллергенами, или анафилактогенами, являются, прежде всего, чужеродные сывороточные белки. Состояние сенсибилизированности наступает уже при введении минимального количества такого белка.

Амфитрихи — подвижные бактерии, с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах (*Spirillum volutans*). (См. жгутики бактерий.)

Анабиоз — состояние организма, характеризующееся обратимым резким замедлением жизненных процессов при отсутствии видимых внешних проявлений жизни; возникает как приспособительная реакция при неблагоприятных условиях окружающей среды.

Анаэробы — организмы, способные жить и развиваться при отсутствии свободного молекулярного кислорода, используя необходимую энергию, высвобождающуюся при расщеплении как органических, так и неорганических соединений, находящихся в среде обитания. Патогенные анаэробы принадлежат к родам *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*. Они широко распространены в природе, где происходит бескислородное разложение органических веществ. (См. аэробы.)

Антагонизм микробный — угнетение жизнедеятельности одного микроба другим. Одна из форм взаимоотношений микробов в ассоциациях. На антагонизме микробном основано получение и применение антибиотиков.

Антибиотики — продукты жизнедеятельности ряда микроорганизмов (актиномицетов, бактерий, плесневых грибов), растений или животных

тканей, угнетающие рост и размножение многих микробов и даже губительно действующие на некоторые из них. Некоторые антибиотики обладают противоопухолевым действием.

Антигены — вещества, вызывающие при введении в организм развитие специфических иммунологических реакций (синтез гуморальных антител или дифференциацию клона сенситивизированных лимфоцитов). Антигенностью обладают белки, полисахариды, карбогидраты, липополисахариды, а также некоторые искусственные высокополимерные соединения. Они характеризуются чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью.

Антигенность — показатель, характеризующий способность антигена индуцировать синтез антител в организме. Существует прямая корреляция между антигенностью и молекулярной массой антигена. Например, по сравнению с сывороточным альбумином, гамма-глобулин имеет более высокую антигенность.

Антигены неполноценные (гаптены) — низкомолекулярные вещества, которые могут реагировать с антителами, но самостоятельно не способны индуцировать их синтез. Однако при соединении их с другими, более крупными молекулами, такими как *carrier*, они приобретают антигенность. При введении таких соединений (*hapten-carrier*) в организм синтезируются антитела как против гаптена, так и против носителя. (См. адъюванты.)

Антигены экзопродуктов — метаболиты бактериальной клетки белковой природы. Наиболее изучены экзотоксины. Антигенные свойства их характеризуются высокой специфичностью и сохраняются после обработки формальдегидом в невысоких концентрациях. Например, *S. perfringens*. (См. антигены бактерий.)

Антисептика — совокупность методов и приемов борьбы с патогенными микроорганизмами, внедрившимися в раны, ткани и полости организма.

Антисыворотка — сыворотка, содержащая специфические антитела против определенного антигена. Антитела синтезируются в результате

переболевания заразной болезнью, вакцинации или гипериммунизации. (См. гипериммунизация.)

Антитела (иммунные тела, иммуноглобулины) — глобулины, синтезируемые в лимфоидной ткани плазматическими клетками после введения антигена в организм. Антитела обладают строгой специфичностью, т. е. вступают в реакцию только с антигеном, индуцирующим их синтез. На специфике реакции «антиген — антитело» основана иммунодиагностика. Установление наличия антител в сыворотке крови указывает на контакт данного организма с определенным возбудителем и является диагностическим признаком.

Антитоксины — антитела, образующиеся при попадании в организм токсинов, обладающих антигенными свойствами. Антитоксины нейтрализуют специфические анатоксины; применяются для лечения и профилактики болезней, возбудители которых продуцируют экзотоксины (столбняк, ботулизм и др.).

Антитела гуморальные — антитела, находящиеся в сыворотке крови. Определение «антитела гуморальные» в сыворотке крови служит одним из основных методов лабораторной диагностики инфекционных болезней.

Антитела моноклональные — антитела, синтезируемые плазматическими клетками единого клеточного клона В-лимфоцита, окончательными звеньями дифференциации которого они являются. (См. моноклональные антитела.)

Асептика — система мероприятий, направленных на обеспечение работы в стерильных условиях, предупреждающих внедрение патогенных микроорганизмов в раны и полости исследуемого организма (объекта).

Аттенуация — искусственное стойкое ослабление, уменьшение вирулентности возбудителей инфекционных болезней. Широко применяется при изготовлении вакцин. Осуществляется адаптацией возбудителя к организму невосприимчивых животных, приспособлением микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды, воздействием бактериофага, антибиотиков, лучистой энергии.

Бактериостатические средства — лекарства, останавливающие или замедляющие размножение бактерий: сульфаниламидные препараты, антибиотики, химиотерапевтические средства.

Бактерицидный — убивающий бактерий (лекарства, антибиотики и т. д.).

Бациллы — палочковидные, грамположительные аэробные микробы, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры. Большинство бацилл — сапрофиты, некоторые служат возбудителями болезней, например *Bac. anthracis*.

Биологическая проба — метод диагностики с помощью заражения подопытных животных патологическим материалом с целью выявления и идентификации возбудителей болезней или их токсинов. Кроме того, биологическая проба служит методом контроля биологических препаратов (вакцин, сывороток) на их безвредность, отсутствие токсичности, пирогенности и оценку активности.

Биотехнология — комплекс естественных или искусственно созданных технологических приемов для создания биологических систем или использования в промышленных и научных целях. Важнейшие направления биотехнологии следующие: энзимная, клеточная и эмбриологическая технология и автоматизированное управление вышеприведенных систем.

Боксы бактериологические — изолированные застекленные камеры, предназначенные для микробиологических и вирусологических исследований в асептических условиях.

Брожение — биологический процесс расщепления сложных органических веществ (спиртовое, молочнокислое).

Биофабрика, биокомбинат — государственное предприятие по производству ветеринарных биологических препаратов, входящее в систему Главного управления биологической промышленности.

Вакцина — биологический препарат, содержащий ослабленные или убитые патогенные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, предназначенные для активной иммунизации (вакцинации) с целью

создания невосприимчивости (иммунитета) организма к определенным инфекционным болезням. Вакцину готовят как из целых микроорганизмов и вирусов, так и из их токсинов или отдельных антигенов. Различают следующие типы вакцин: живые, убитые, химические анавакцины, анатоксины.

Вакцинопрофилактика — вакцинирование с целью предупреждения (профилактики) инфекционных болезней. Вакцинопрофилактику подразделяют на плановую и вынужденную. Плановую осуществляют с предохранительной целью в угрожаемой болезнью зоне, вынужденную — при возникновении болезни с целью ее ликвидации.

Вакцинотерапия — лечение инфекционных болезней с помощью вакцин. Применяется главным образом при хроническом течении болезни (стафилококкозах, стрептококкозах), основана на многократном воздействии на организм специфическим антигенным раздражителем, сопровождающимся выработкой антител и повышением общей сопротивляемости организма.

Вирулентность — степень патогенности и индивидуальных особенностей каждого штамма патогенного микроорганизма, направленная на преодоление естественных защитных сил макроорганизма определенного вида, способностью проникать в него, размножаться и образовывать токсины. Вирулентность обуславливает инвазивность, биологические свойства микроорганизма и резистентность макроорганизма. Она колеблется в широких пределах в зависимости от вида и возраста животных, условий их кормления и содержания. Утрату вирулентности называют авирулентностью.

Восприимчивость к инфекции — способность организма отвечать на внедрение, размножение и жизнедеятельность патогенных агентов комплексом защитно-приспособительных реакций, развитием инфекции. Восприимчивость к инфекции — одно из проявлений реактивности организма, которое зависит от вида и возраста животных, физиологического состояния организма, наличия и напряжен-

ности иммунитета, патогенности и вирулентности агента, его дозы и других факторов.

Гемолиз — процесс разрушения нормальных эритроцитов с выделением из них в окружающую среду гемоглобина. Гемолиз наблюдается при механических, химических или серологических воздействиях. (См. гемолизины.)

Гемолизины — вещества (антитела), вызывающие гемолиз. Различают неспецифические гемолизины (продукты жизнедеятельности многих бактерий, вирусов, паразитов, некоторые змеиные яды) и специфические иммуногемолизины (антитела).

Генная (генетическая) инженерия — отрасль биологической науки, изучающая закономерности конструирования *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК и поведение их в реципиентной клетке. Цель генной инженерии — создание новых генетических структур, рекомбинантных молекул. Основа генной инженерии была заложена в 1972 г. в Национальной академии наук США.

Генотип — совокупность всех наследственных факторов организма, как ядерных (геном), так и неядерных, внехромосомных. Генотип микроорганизмов — потенциальная способность к фенотипическому выражению любого их признака. Генотип — носитель наследственной информации, передаваемой из поколения в поколение.

Гены — фрагменты молекулы ДНК, у некоторых вирусов РНК, контролирующие синтез одного белка. В них записана генетическая информация обо всех признаках, присущих клетке.

Гемотоксины — вещества микробного, растительного или животного происхождения, способные повреждать оболочку эритроцитов и вызывать их гемолиз. К микробным гемотоксинам относят токсины стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и других бактерий.

Гетеротрофы — микробы, получающие углерод главным образом из готовых органических соединений в противоположность аутоτροφным. Гетеротрофы — возбудители различного рода брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные

микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза и ряд других патогенных возбудителей.

Гипериммунизация — иммунизация животных большими дозами антигена (путем повторных введений) с целью получения специфических лечебных или диагностических сывороток.

Гнотобиоты (гнотобионты) — животные, выращиваемые в особых условиях, полностью свободные от микрофлоры или носители только определенных видов микроорганизмов.

Гомогенный — однородный (по структуре и составу), бесструктурный, обладающий одними и теми же свойствами, но обнаруживающий восприимчивых глазом различий строения.

Гомологичный — соответственный, подобный, сходный.

Дезинфекция — обеззараживание, уничтожение возбудителей инфекционных болезней (бактерий, вирусов, риккетсий и т. д.) во внешней среде путем применения физических и химических средств.

Дерматомикозы — болезни кожи, вызываемые патогенными грибами.

Дисбактериоз — изменение нормальной микрофлоры животного организма, в частности в кишечнике, характеризующееся уменьшением количества типичных микробов и появлением атипичных видов бактерий, не способных выполнять функцию биологического барьера. Возникает обычно при нерациональной антибиотикотерапии.

Диссоциация бактерий — появление в популяции бактерий особей, отличающихся от исходного типа внешним видом и структурой колоний, а также наследственно закрепленными изменениями некоторых морфологических, культуральных и биологических свойств. При этом основные таксономические характеристики данного вида обычно сохраняются.

Донор — микроорганизм, передающий свои хромосомы (гены) другому микроорганизму и способный вызвать мутацию. Понятие донор применимо также к животным/людям, у которых берут органы/ткани для трансплантации, кровь для приготовления сывороток и переливания с лечебной целью.

Единица вирулентности — величина, характеризующая степень патогенности микробов. За единицу вирулентности принимают наименьшее количество живых микробов, вызывающих в определенный срок гибель около 80% лабораторных животных. Наиболее применима LD₅₀ (доза, убивающая половину инфицированных животных), которая обеспечивает наименьшую ошибку в оценке вирулентности патогенных бактерий. Минимальная смертельная доза DLm (*dosis letalis minima*) вызывает смерть большинства подопытных животных.

Жгутики бактерий — органоиды движения бактерий. Состоят из белковых веществ типа флагеллина, относящегося к классу сократимых белков (кератин, миозин, фибриноген). По расположению жгутиков подвижные микробы подразделяют на четыре группы. (См. монотрихи, амфитрихи, лофотрихи, перитрихи.)

Зооантропонозы — группа заразных болезней, общих для животных и человека. Они передаются от одного вида животного к другому и от животного к человеку.

Зоонозы — группа болезней, свойственная только животным (например, контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, чума свиней, мыт лошадей).

Идентификация микроорганизмов — система микроскопических, культуральных, биохимических, серологических исследований и определения патогенных свойств для установления этиологического агента, определения его вида (*species*), подвида (*subspecies*), а при необходимости также серовара (*varietas*), его места в микробиологической (вирусологической) классификации. Идентификация микроорганизмов — заключительный этап диагностики бактериальных инфекций.

Изменчивость микроорганизмов — способность к изменениям некоторых признаков и свойств при жизни, которую подразделяют на наследственные (вызываемые факторами окружающей среды) и наследственные (причиняемые мутациями и генетическими рекомбинациями).

Иммунизация — метод специфической профилактики инфекцион-

ных болезней путем создания в организме искусственного иммунитета. Различают активную и пассивную иммунизацию.

Иммунитет, невосприимчивость — способность организма защищать себя от веществ как инфекционной, так и неинфекционной природы, несущих для него чужую генетическую информацию, с целью сохранения необходимого для существования гомеостаза. Различают активный, пассивный и другие виды иммунитета.

Иммунитет антибактериальный — невосприимчивость организма к определенным бактериальным инфекциям, выработанная после переболевания, активной или пассивной иммунизации. Он достигается совокупностью действия неспецифических (фагоцитоза, различных гуморальных веществ) и специфических (антител) защитных факторов организма.

Иммунная сыворотка — сыворотка, содержащая специфические антитела, полученная от иммунизированного (вакцинированного) или переболевшего животного. Применяют для лечения или профилактики (пассивная иммунизация) определенных инфекционных болезней.

Иммунодепрессия — угнетение иммунореактивности организма различными способами.

Иммунокомпетентность — иммунореактивность, способность организма ответить на введение антигена иммунной реакцией. Она связана с развитием и состоянием лимфоидной (иммунной) ткани.

Иммунологическая память — способность организма отвечать ускоренной и усиленной иммунной реакцией при повторном контакте с ранее введенным антигеном. Она сохраняется в течение многих месяцев, а при воздействии некоторых антигенов и годы. Иммунологическая толерантность — иммунологическая ареактивность, состояние организма, при котором не происходит иммунной ответной реакции на введение антигена.

Иммунотерапия — метод лечения инфекционных больных путем воздействия на иммунную систему организма. Применяют иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, гамма-глобулиновые пре-

параты, вакцины. (См. серотерапия, вакцинотерапия.)

Интерферон — группа близкородственных белков, обладающих способностью тормозить репликацию вирусов и опухолевых клеток, служит важнейшим фактором при формировании неспецифической резистентности организма в случае вирусных инфекций, вызывая интерференцию. Чувствительность различных вирусов к интерферону неодинакова. Препараты интерферона применяют для профилактики и терапии вирусных заболеваний.

Инфекция — явление, специфической сущностью которого является внедрение и размножение инфекционного агента в макроорганизме с последующим развитием различных форм их взаимодействия — от носительства возбудителя до выраженного проявления болезни. Инфекционный процесс — комплекс реакций, возникающих в макроорганизме при инфекции и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой.

Клон — полученное бесплодным путем генетически однообразное вегетативное потомство одного вируса или одноклеточного (многоклеточного) организма. Клон служит предпосылкой для определения перманентной линии (культуры) клеток. Время существования клона как совокупности наследственно-однородных клеток ограничено, так как среди родственных особей могут развиваться путем мутации клетки с новыми свойствами. (См. штамм.)

Коли-индекс — количество особей кишечной палочки, содержащихся в 1 л (1 кг) исследуемого продукта. Его определяют путем подсчета числа выросших колоний *E. coli* на плотной питательной среде при посеве исследуемого субстрата в разных разведениях. Он служит индикатором фекального загрязнения воды, пищевых продуктов и других объектов окружающей среды. Водопроводная вода пригодна для питья, если коли-индекс не более 3.

Коли-титр — величина, выражающая наименьшее количество исследуемого материала (в мл, в г), в котором обнаружена одна кишечная палочка. Для определения титра кишечной па-

лочка исследуемый продукт в уменьшающихся объемах засевают в жидкие (реже — на плотные) среды. Его используют как показатель фекального загрязнения воды, молока и т. д.

Колония бактериальная — изолированное скопление клеток бактерий одного вида на поверхности или внутри плотных или полужидких питательных сред в результате размножения одной бактериальной клетки. Внешний вид и строение колоний часто имеют свои особенности и могут служить ориентировочным признаком для их идентификации.

Комплемент — комплекс термолabileльных белков свежей сыворотки крови животных и человека, играющий важную роль в иммунологических реакциях организма (вместе с амбоцептором третьего ряда лизирует — растворяет бактерии и другие клетки). Без комплемента амбоцептор неактивен. (См. антитела.)

Консерванты — вещества, используемые для предотвращения разложения органических соединений. Часто для консервации сывороток используют борную кислоту, тимол, мертиолат, фенол, азид натрия. В иммунологических исследованиях возникает необходимость консервации не только сывороток, но и антигенов, агар-агара при постановке реакции преципитации, а также других соединений, на которых могут расти бактерии.

Контагиозность — способность болезни распространяться вследствие передачи возбудителя при непосредственном соприкосновении больных и здоровых животных или через промежуточные объекты. Наиболее контагиозными принято называть быстро и широко распространяющиеся болезни (ящур, оспа, чума свиней, грипп лошадей и др.).

Контаминация — обсеменение поверхности тела животного, предметов ухода, почвы, воды, кормов, биопрепаратов и других объектов патогенными микроорганизмами.

Конъюгация — процесс временного объединения двух особей у одноклеточных организмов, связанный с переносом генетического материала (части генома) из одной особи в другую; эволюционный аналог полового размножения.

Конъюнктивальная проба — один из методов оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа. Применяют с целью диагностирования животных, больных туберкулезом, сапом. Для этого в конъюнктивальный мешок глаза закапывают с интервалом 24–48 ч несколько капель туберкулина (или маллеина). У больных животных реакция сопровождается воспалением конъюнктивы, появлением гнойных выделений. Здоровые животные не реагируют на введение аллергена или у них может наблюдаться легкое слезотечение (конъюнктивит).

Коха феномен — явление, составляющее основу туберкулиновой пробы. Р. Кох установил, что при введении убитых туберкулезных палочек морским свинкам, больным туберкулезом, на месте инъекции возникает сильная некротическая реакция. У здоровых животных подобного явления не наблюдается. Так был найден метод диагностики заболевания туберкулезом (реакция гиперчувствительности замедленного типа).

Культура чистая (синоним — монокультура) — культура микроорганизма, содержащая особи лишь одного вида.

Культура бактериальная — популяция (см.) жизнеспособных бактерий, выращенная на плотной или в жидкой питательной среде. Чистая культура бактериальная — бактерии, выделенные из одной колонии одного вида. (См. штамм.)

Летальная (смертельная) доза — доза микроорганизмов, вызывающая смерть у 100% экспериментально зараженных животных.

Лизис микроорганизмов — растворение микроорганизмов под влиянием специфических бактериолизатов, бактериофагов, лизоцима, антибиотиков и других средств.

Лизоцим — энзим, расщепляющий сложные полисахариды клеточной оболочки и вызывающий лизис грамположительных микроорганизмов. Лизоцим всегда присутствует в белке яйца, в слезе, слюне, молоке, сыворотке крови и других биологических тканях.

Лофотрихи — подвижные бактерии, у которых жгутики располага-

ются в виде пучка на одном конце. (См. жгутики бактерий, монотрихи.)

L-формы бактерий — своеобразные формы изменчивости бактерий, характеризующиеся появлением крупных шаровидных и нитевидных плазматических структур. Названы в честь Института Листера, где были открыты в 1935 г. Образование L-форм бактерий происходит в результате угнетения синтеза клеточной стенки, которое ведет к нарушению координации между ростом и делением клетки. Наиболее часто они возникают под влиянием антибиотиков, некоторых аминокислот, биологически активных веществ (лизоцима, комплемента), при ультрафиолетовом и рентгеновском излучении.

Лиофилизация — лиофильная сушка, сублимационное высушивание, метод высушивания биологических объектов (например, вирусов, микробов) и пищевых продуктов в замороженном состоянии под вакуумом.

Макрофаги — большие фагоциты, фагоцитарные клетки, интенсивно фагоцитирующие для организма чужеродный материал. Особую роль макрофаги играют в иммунном ответе. Макрофаги активно участвуют в синтезе антител, кооперируя с Т- и В-лимфоцитами. Они предварительно обрабатывают антиген и превращают его в более доступный для лимфоцитов.

Метаболизм — основной обмен веществ, совокупность химических превращений, происходящих в живом организме, состоящих из ассимиляционной (анаболизм) и диссимиляционной (катаболизм) фаз.

Микробный пейзаж — понятие, характеризующее особенность микроорганизмов при их взаимодействии друг с другом, с окружающей средой. Исследование свойств как отдельных видов микроорганизмов, так и ассоциаций их имеет большое значение в ветеринарной микробиологии.

Микроорганизмы — мельчайшие организмы, не видимые невооруженным глазом, принадлежащие к трем царствам: прокариоты; эукариоты; вирусы. Многие виды микроорганизмов патогенны для человека, животных и растений. Впервые микроорганизмы были описаны в 1683 г. нидер-

ландским биологом А. Левенгуком (1632–1723).

Макрофаги — полиморфоядерные клетки (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) крови, обладающие фагоцитарной способностью. Объектами их фагоцитоза чаще служат бактерии в очаге воспаления (возбудители острых инфекций). (См. макрофаги.)

Микрофлора — микробный пейзаж, совокупность различных видов микроорганизмов, характерных для данного вида животного, совокупность видов микроорганизмов, обнаруженных на поверхности или в полостях тела, ране и др.

Моноклональные антитела — строго специфические антитела, способные выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул. Каждое антитело является продуктом отдельного клона антителопродуцирующих клеток.

Монотрихи — подвижные бактерии, имеющие по одному жгутику на одном из полюсов бактериальной клетки.

Мутагены — физические и химические факторы, вызывающие в организме стойкие наследственные изменения — мутации. (См. мутация.)

Мутация, мутационная изменчивость — наследуемые изменения гена или генов, контролирурующих определенные наследственные признаки. Мутации подразделяют по происхождению на спонтанную и индуцированную. Они свойственны всем живым организмам — от вирусов до человека.

Нормальные антитела (синоним — природные антитела) — антитела, которые могут реагировать с различными антигенами (вирусами, бактериями и т. д.), хотя ранее организм не подвергался иммунизации этими антигенами. Такие антитела получили название нормальных.

Нуклеоид — ядро прокариотов, состоящее из единственной гигантской хромосомы, не изолированной от цитоплазмы мембраной.

Нуклеотиды — составные части ДНК и РНК. Каждый нуклеотид в молекуле ДНК состоит из одного азотистого основания, пятиуглеродного углевода, дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В РНК сахар

представлен рибозой, а тимин заменен урацилом.

Опсонины — иммуноглобулины классов G и M, содержащиеся в нормальной и иммунной сыворотке крови животных и человека, облегчающие фагоцитоз бактерий и определяющие уровень сопротивляемости организма к вредным агентам. Они проявляют свое действие в присутствии комплемента, стимулируя поглощение чужеродных частиц, бактерий, вирусов и их разрушение лейкоцитами.

Паразит — организм, живущий на поверхности или внутри другого организма и питающийся за его счет.

Пастеризация — способ обеззараживания органических жидкостей (молока, фруктов, соков и т. д.) путем нагревания их до 100°C (чаще 75–80°C) в течение 30 мин для разрушения вегетативных форм микробов с последующим охлаждением до 4–6°C; споры при этом не уничтожаются.

Патогенность, болезнетворность — способность микробов вызывать инфекционный процесс у макроорганизмов определенного вида. Патогенность представляет сложный комплекс болезнетворных свойств микроорганизма, сформировавшийся в процессе борьбы за существование и приспособления к паразитированию в организмах растений, животных и человека.

Пиемия — форма сепсиса, отличающаяся от септицемии более длительным течением и образованием вторичных очагов гнойной воспаления (метастазов) в различных органах (в частности, в печени, легких). (См. сепсис.)

Питание микроорганизмов — усвоение питательных веществ, предварительно расщепленных ферментами до аминокислот, глюкозы, жирных кислот, путем внешнего или внеклеточного переваривания. По типам питания микроорганизмы делят на аутотрофы и гетеротрофы. (См. метаболизм.)

Плазмиды (эписомы) — внехромосомные генетические элементы бактерий, которые обладают способностью к автономному размножению и могут детерминировать. Например, способность к передаче генетического

материала донора при конъюгации (F-плазмиды), устойчивость к антибиотикам, сульфаниламидам и другим лечебным препаратам. Благодаря плазмидам лекарственная резистентность легко передается от одних бактерий к другим.

Плеоморфизм — существование одной популяции микробов в виде разных форм. (См. полиморфизм.)

Полиморфизм — форма существования одного и того же образования в различных видах.

Получия — совокупность особей одного вида макро- и микроорганизмов, длительно населяющих среду при определенных условиях. В естественной среде обитания микроорганизмы в большинстве случаев существуют в ассоциации различных видов, иногда симбиотически связанных между собой, иногда подавляющих развитие отдельных видов.

Постулаты Коха, по имени немецкого ученого Р. Коха (1843–1910), рассматривают условия, при которых данный микроорганизм может быть признан возбудителем болезни.

1. Обнаружен во всех случаях болезни, но не встречается у здоровых макроорганизмов и при других болезнях.

2. Выделен из организма больного в чистой культуре.

3. При введении чистой культуры возбудителя болезни восприимчивому животному или человеку возникает болезнь или появляются специфические антитела.

Препараты биологические, биопрепараты — средства биологического происхождения, используемые для диагностики, профилактики и лечения заразных больных. Диагностические — аллергены, антигены, сыворотки, бактериофаги; профилактические — вакцины, анатоксины; лечебные — специфические гипериммунные сыворотки и гамма-глобулины; стимулирующие средства — сыворотка крови животных, СЖК, препарат АСД, препарат витамина В₁₂ и др.

Преципитация — иммунологическая реакция, взаимодействие растворимого антигена (преципитогена) и антитела (преципитина) в присутствии электролита (0,85% -ный раствор NaCl) с образованием преци-

питата. В основе преципитации заложено физико-химическое взаимодействие высокодисперсных коллоидов. Реакцию преципитации широко применяют в иммунодиагностике инфекционных болезней (сибирская язва, оспа, туляремия и др.).

Продромальный период — период предвестников инфекционной болезни, характеризующийся первыми, но не всегда специфическими для конкретной болезни симптомами (температура, слабость, угнетение, отсутствие аппетита и др.).

Прокариоты — доядерные микробы, характеризующиеся отсутствием внутриплазматической сеточки организованного ядра. (См. бактерии.)

Пропердин — антимикробный фактор, белок нормальной сыворотки, содержащий отдельные компоненты комплемента и ионы магния. Предполагают, что он относится к термолabileм IgM-глобулинам, но, в отличие от антител, не обладает специфичностью. Оказывает обезвреживающее действие на многие микробы и вирусы. Пропердин обуславливает бактерицидные свойства крови.

Реакторы микробиологические — аппараты для выращивания в больших количествах микробов, используемых для изготовления вакцин и анатоксинов. Их применение дает возможность в одном аппарате стерилизовать питательную среду, выращивать при нужной температуре бактерии, инактивировать их и расфасовывать приготовленные биопрепараты.

Резистентность естественная — повышенная устойчивость организма к инфекции, обусловленная не активной или пассивной иммунизацией, а ее биологическими особенностями. Она связана с уровнем неспецифических защитных сил организма: комплемента, лизоцима, пропердина, бактерицидной активности крови, поглотительной активности лимфоидно-макрофагальной системы.

Рекомбинация генетическая — перегруппировка генетического материала (ДНК), родительских генетических структур (хромосом, плазмид и др.), приводящая к появлению новых сочетаний генов у потомства. У микроорганизмов она осуществля-

ется в результате обмена участками двух молекул ДНК (либо их фрагментов).

Реципиент — живой организм, которому вводят материал (кровь, ткань и др.), взятый от другого объекта — донора.

Реконвалесцент — организм, находящийся в стадии выздоровления. В иммунопрофилактике и терапии инфекционных болезней реконвалесцент служит объектом для получения сыворотки, содержащей специфические антитела. (См. иммунотерапия.)

Сапрофиты — растения и микроорганизмы, главным образом бактерии и грибы, питающиеся органическими веществами отмерших организмов или выделениями живых. Они относятся к гетеротрофным организмам, играют роль в круговороте веществ в природе.

Сенсибилизация — приобретение организмом специфической повышенной чувствительности к чужеродным веществам, чаще белковой природы, аллергенам. Сенсибилизацию могут вызвать бактерии, вирусы, сыворотки и химические вещества.

Сепсис — состояние организма, при котором патогенные микроорганизмы, проникшие из первичного очага инфекции в кровь, размножаются в ней и заносятся во все ткани и органы, где вызывают воспалительные и дегенеративно-некротические процессы. Клиническая картина сепсиса не зависит от вида возбудителя инфекции.

Септикопиемия — смешанная форма сепсиса, периодическое поступление в кровь микробов из первичного септического очага и образования вторичных абсцессов (очагов гнойного воспаления).

Септицемия — форма сепсиса, при которой наличие патогенных микроорганизмов в крови не сопровождается образованием метастатических очагов гнойного воспаления. (См. сепсис.)

Серодиагностика — методы лабораторной иммунодиагностики, входящие в диагностический комплекс инфекционных болезней. Для серодиагностики используют различные серологические реакции. (См. серологические реакции.)

Серологические реакции — методы иммунодиагностики, разработанные

для обнаружения в сыворотке крови антител или антигена. Такие реакции специфичны и основаны на взаимодействии антигена и антитела. К ним относятся реакции агглютинации, связывания комплемента, преципитации, нейтрализации, гем-агглютинации, а также методы определения групп крови и преципитационные пробы в судебно-ветеринарной экспертизе.

Серопрофилактика — пассивная иммунизация — метод, при котором в организм для предотвращения инфекционной болезни вводят гипериммунные, содержащие специфические антитела к антигенам возбудителей этих болезней (см. иммунная сыворотка). Серопрофилактика дает краткосрочный иммунитет по сравнению с вакцинопрофилактикой, однако обеспечивает более быстрое его достижение.

Споры — зародышевые клетки, служащие для бесполового размножения некоторых одноклеточных организмов. Споры бактерий — овальные образования, представляющие собой особую форму существования определенных видов бактерий, они служат средством сохранения вида в неблагоприятных условиях. В автоклаве погибают при 120°C. В почве могут сохраняться десятилетиями.

Среды питательные — различные искусственные среды для культивирования микробов с целью выделения возбудителя болезни из исследуемого материала и определения его вида, для накопления микробной массы при изготовлении биологических препаратов.

Стерилизация — уничтожение микробов с помощью высокой температуры или химических веществ.

Таксономия — раздел систематики, изучающий принципы и правила классификации организмов, в том числе и микробов. Таксономические категории, так называемые таксоны, — соподчинение иерархическим группам объектов: вид, род, семейство, порядок, класс, отдел.

Тиндализация — метод дробной стерилизации, заключающийся в повторном воздействии на стерилизуемые питательные среды относительно невысокой температурой с суточными

интервалами. Тиндализация применяется в том случае, если стерилизуемый объект не может быть нагрет выше 100°C. Ее используют в микробиологии для стерилизации питательных сред, содержащих углеводы, желатин и т. д.

Токсемия — наличие токсинов в крови, общее болезненное состояние организма, вызванное циркуляцией в крови токсинов. Типичные симптомы токсемии проявляются при ботулизме, столбняке, сальмонеллезах и др. болезнях.

Токсины — вещества бактериального, растительного или животного происхождения, вызывающие при попадании в организм человека или животного болезнь или смерть. Например, токсин ботулинический, токсин столбнячный, токсин эшерихий и др.

Трансдукция — процесс переноса генетических фрагментов ДНК от донорской бактериальной клетки к реципиентной, осуществляемый бактериальными вирусами (бактериофагами).

Транскрипция — процесс передачи информации от ДНК к РНК, который происходит путем синтеза цепочки РНК, имеющей последовательность нуклеотидов, комплементарную матричному участку одной из цепочек ДНК, откуда транскрибируется генетическая информация с помощью энзима РНК-полимеразы. Далее РНК переносит информацию на рибосомы, где происходит синтез соответствующих белков.

Трансформация бактерий — преобразование, превращение, изменение морфофункциональных свойств бактерий путем передачи наследственных свойств от одних бактерий (доноров) другим (реципиентам) при помощи экстрагированной ДНК, без прямого контакта донора и реципиента и без участия бактериофага.

Условно-патогенные микробы — потенциально патогенные микробы, обитающие в макроорганизме как комменсалы и вызывающие инфекционный процесс лишь при ослаблении резистентности хозяина.

Фагоцитоз — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных микробов с последующим перевариванием при помощи внеклеточных ферментов.

Фагоциты — клетки, с помощью которых осуществляется фагоцитоз.

Фенотип — совокупность признаков и свойств организма, сформировавшихся в процессе его индивидуального развития и определяющих сущность данной особи.

Фимбрии — бахрома или реснички длиной 0,3–1,0 мкм, значительно короче и тоньше жгутиков, покрывающие тело микробной клетки и способствующие прикреплению микроба к поверхности субстрата. Количество фимбрий у одного микроба достигает 100–400. Они не служат органами передвижения.

Флагеллин, пилин — полимерный компонент Н-антигена у жгутиковых бактерий. Его используют при идентификации микробов.

Фотоаутотрофы — микробы, способные ассимилировать углекислоту за счет использования солнечной энергии. (См. фототрофы.)

Фототрофы — фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие солнечную энергию.

Хемотаксис — процесс, вызываемый разницей в концентрации химических веществ в среде, где локализуются микроорганизмы.

Шок анафилактический — реакция сенсibilизированного организма на повторное парентеральное введение чужеродного белка. Проявляется беспокойством животного, сильной одышкой, учащением пульса, судорогами, слюнотечением, усиленным потоотделением. Возможен летальный исход.

Штамм — культура микроорганизма одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами. Штаммы микроорганизмов могут отличаться друг от друга по вирулентности, чувствительности к антибиотикам, способности к токсинообразованию. Штаммы с высокими иммуногенными свойствами применяют для изготовления вакцин.

Экология микроорганизмов — наука, изучающая взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой.

Эндоспоры — споры, образующиеся внутри микробной клетки, устойчивые к воздействию химических дезинфицирующих веществ и к высоким температурам; образуют только

бактерии из семейства *Bacillaceae* (родов *Bacillus* и *Clostridium*).

Эндотоксины — токсины, которые являются структурными компонентами грамотрицательных микробных клеток, поступают в окружающую среду после их гибели и разрушения, термостабильны, менее ядовиты и слабее по антигенным свойствам, чем экзотоксины. Они тесно связаны с соматическим антигеном бактериальной клетки и представляют липополисахаридные комплексы, не инактивирующиеся формалином. (См. токсины.)

Энзимы бактерий — биологические катализаторы белковой природы, обладающие специфичностью и играющие важную роль в обмене веществ микроорганизмов. Разные виды микроорганизмов отличаются друг от друга по набору энзимов, что имеет дифференциально-диагностическое значение при их идентификации.

Энзоотия — эпизоотологическая категория, указывающая на распространение инфекционной болезни животных в определенной местности, хозяйстве, населенном пункте.

Энтеротоксины — экзотоксины, продуцируемые токсигенными возбудителями: эшерихиями, сальмонеллами, клостридиями, стафилококками. Энтеротоксины обладают энтеротропным действием, поэтому их продукция в химусе пищеварительного тракта сопровождается диареей, явлениями дегидратации и другими расстройствами. Они устойчивы к действию пищеварительных энзимов. Вызывают

пищевые токсикозы. Наиболее сильное действие оказывает энтеротоксин — ботулинический.

Эпизоотия — средняя степень интенсивности (напряженности) эпизоотического процесса. Характеризуется широким распространением какой-либо инфекционной болезни, охватывающей хозяйство, район, область, страну. При этом заболеваемость превышает обычный для данной местности уровень. Эпизоотии свойственно нарастание числа случаев болезни (массовость заболевания) при общности источников возбудителя инфекции.

Этиология — раздел патологии о причинах и условиях возникновения болезней. Различают эндогенные причины болезни — внутренне-го происхождения (наследственные аномалии, пороки развития) и экзогенные — необычные для организма воздействия физических, химических, биологических факторов внешней среды. Специфической причиной инфекционной болезни являются патогенные микроорганизмы (бактерии, вирусы, микроскопические грибы).

Эукариоты — организмы (все, кроме бактерий, включая цианобактерии), обладающие, в отличие от прокариот, оформленным клеточным ядром, ограниченным от цитоплазмы оболочкой. Генетический материал заключен в хромосомах. Клетки эукариотов имеют митохондрии, плазмиды и другие органоиды.

1. *Блохина, И. Н.* Систематика бактерий (с основами геносистематики): Монография / И. Н. Блохина, Г. Ф. Леванова, А. С. Антонов. — Нижний Новгород : Издательство Нижегородского ун-та, 1992. — 171 с.
2. *Воронин, Е. С.* Иммунология / Е. С. Воронин [и др.] — М. : Колос-пресс, 2002. — 408 с.
3. *Госманов, Р. Г.* Основы противомикробного иммунитета / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев. — Омск : ОмГАУ, 2002. — 119 с.
4. *Госманов Р. Г.* Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Р. Г. Госманов [и др.] — Омск : Издательство ОмГАУ, 2008. — 309 с.
5. Иммунология / Под ред. У. Пола. — М. : Мир, 1988. — Т. 1–3.
6. Иммунология. — М. : Колосс, 2002. — 264 с.
7. *Колычев, Н. М.* Зоопатогенные бактерии и меры борьбы с ними: Монография / Н. М. Колычев, В. Г. Ощепков. — Омск : Издательство ОмГАУ, 2001. — 632 с.
8. *Колычев, Н. М.* Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. — М. : Колосс, 2003. — 431 с.
9. *Коляков, Я. Е.* Ветеринарная иммунология. — М. : Агропромиздат, 1986. — 270 с.
10. *Костенко, Т. С.* Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко [и др.]. — М. : Колосс, 2001. — 344 с.
11. Краткий словарь микробиологических, вирусологических, иммунологических и эпизоотических терминов / Под ред. Н. М. Колычева. — Омск, 2003.
12. *Петров, Р. В.* Иммунология. — М. : Медицина, 1982. — 368 с.
13. *Петрович, С. В.* Микозы животных. — М. : Росагропромиздат, 1989. — 173 с.
14. *Петрович, С. В.* Микотоксикозы животных. — М. : Росагропромиздат, 1991. — 237 с.
15. *Скородумов, Д. И.* Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. — М. : Изд-во «Изографъ», 2005. — 656 с.
16. *Хазипов, Н. З.* Биотехнология в ветеринарии: Учеб. пособие / Н. З. Хазипов, Р. П. Тюрикова. — Казань, 1988. — 69 с.
17. *Хазипов, Н. З.* Генетическая инженерия в ветеринарии: Учеб. пособие / Н. З. Хазипов, Р. П. Тюрикова. — Казань, 1991. — 72 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
Предисловие	6

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ ОСНОВЫ ОБЩЕЙ И ЧАСТНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Глава 1. Общая микробиология	10
1.1. История возникновения, предмет и задачи микробиологии	10
1.2. Особенности морфологии и строения различных групп микроорганизмов	25
1.3. Физиология микроорганизмов	55
Химический состав микроорганизмов	55
Окислительно-восстановительный потенциал питательной среды	70
1.4. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы и практическое их использование	76
1.5. Экология микроорганизмов	94
1.6. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе	105
Круговорот азота	105
Круговорот углерода	109
Круговорот фосфора, железа и серы	115
1.7. Генетика микроорганизмов	116
Материальные основы наследственности	117
Наследственность и изменчивость	118
Глава 2. Частная микробиология	134
2.1. Патогенные кокки	134
Стафилококки	134
Стрептококки	137
2.2. Возбудители туберкулеза и паратуберкулеза	139
Возбудитель туберкулеза	139
Возбудитель паратуберкулеза животных	143

2.3.	Возбудитель актиномикоза	146
2.4.	Возбудитель сибирской язвы	149
2.5.	Патогенные анаэробы	156
	Возбудитель ботулизма	156
	Возбудитель столбняка	160
	Клостридии перфрингенса	163
2.6.	Энтеробактерии	165
	Возбудитель сальмонеллеза	165
	Возбудитель колибактериоза	168
2.7.	Возбудитель антропозоонозной чумы	170
2.8.	Возбудитель бруцеллеза	174
2.9.	Возбудитель туляремии	179
2.10.	Возбудитель пастереллеза	182
2.11.	Возбудитель сапа лошадей	184
2.12.	Возбудители некробактериоза, копытной гнили и мелиоидоза животных.	186
	Возбудитель некробактериоза	186
	Возбудитель копытной гнили	189
	Возбудитель мелиоидоза (ложного сапа)	191
2.13.	Возбудитель кампилобактериоза	192
2.14.	Возбудители лептоспироза, листериоза и рожи свиней ...	195
	Возбудитель лептоспироза	195
	Возбудитель листериоза	198
	Возбудитель рожи свиней	201
2.15.	Возбудитель контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота	204
2.16.	Возбудитель риккетсиоза (Ку-лихорадка)	206
2.17.	Возбудитель хламидиозов животных	209
2.18.	Микроскопические грибы	212
2.19.	Возбудители дерматомикозов	213
	Возбудители трихофитии	213
	Возбудители микроспории	216
2.20.	Возбудители микотоксикозов	217
	Возбудители аспергиллотоксикозов	218
	Возбудители фузариотоксикоза	219
	Возбудитель стахиботриотоксикоза	221
2.21.	Возбудители вирусных инфекций	225

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ

Глава 3. Учение об инфекции	232	
3.1. Типы биотических взаимоотношений микроорганизмов с макроорганизмом	232	
3.2. Понятие об инфекции, инфекционном процессе и инфекционной болезни	234	
	Возникновение инфекции путем внедрения и распространения патогенных микробов в организме ...	239
	Патогенность и вирулентность микроорганизмов	240
	Роль макроорганизма и условий окружающей среды в возникновении и развитии инфекционного процесса ..	245
3.3. Особо опасные болезни, перекрестно передающиеся от животных к человеку и наоборот	247	

Глава 4. Введение в основы иммунологии	249
4.1. Классификация иммунитета	253
4.2. Неспецифические (естественные) факторы иммунитета	259
Анатомо-физиологические факторы	
неспецифической резистентности	259
Гуморальные факторы	
неспецифической резистентности	261
Клеточные факторы	
неспецифической резистентности	265
4.3. Специфические факторы иммунитета	266
Формы иммунного реагирования (иммунный ответ)	271
Гуморальные факторы. Антитела (иммуноглобулины)	274
Реакция «антиген — антитело», используемая	
при диагностике инфекционных болезней	279
Клеточные факторы (клеточный иммунитет)	289
Имунологическая толерантность	290
Имунопатологические реакции	292
Иммунодефициты	303
Глава 5. Основные биопрепараты	306
5.1. Вакцины	306
5.2. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины	311
5.3. Диагностические антигены и аллергены	314
5.4. Бактериофаги-вирусы	315
5.5. Лиофилизация микроорганизмов	316
5.6. Правила использования и хранения биопрепаратов,	
их транспортировка	317

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ
ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

<i>Тема 1.</i> Задачи бактериологической лаборатории, техника безопасности при работе с микроорганизмами. Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала. Световой микроскоп, особенности микрофотографирования при использовании иммерсионной системы. Основные формы бактерий	320
<i>Тема 2.</i> Бактериологические краски. Методика приготовления препарата для микрофотографии. Простой метод окрашивания	330
<i>Тема 3.</i> Сложные методы окрашивания. Окраска по Граму	335
<i>Тема 4.</i> Биологическое значение образования спор и капсул, методы их окрашивания. Изучение подвижности бактерий	338
<i>Тема 5.</i> Микроскопические грибы: плесневые грибы и дрожжи. Их морфологические особенности	344
<i>Тема 6.</i> Методы стерилизации питательных сред и посуды	351
<i>Тема 7.</i> Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов, их классификация	357
<i>Тема 8.</i> Методы культивирования аэробных, микроаэрофильных и анаэробных бактерий	368

<i>Тема 9.</i> Техника посевов и пересевов. Методы выделения чистых культур бактерий	375
<i>Тема 10.</i> Культуральные свойства микроорганизмов	381
<i>Тема 11.</i> Ферментативные свойства бактерий	385
<i>Тема 12.</i> Серологическая диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных	392
<i>Тема 13.</i> Реакция агглютинации: пробирочный метод. Другие модификации постановки реакции	400
<i>Тема 14.</i> Реакция связывания комплемента (РСК)	408
<i>Тема 15.</i> Метод флуоресцирующих антител (МФА). Иммуноферментный анализ (ИФА)	420
<i>Тема 16.</i> Использование в микробиологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) и применение ДНК-зондов	428
<i>Тема 17.</i> Индикация возбудителя колибактериоза (эшерихиоза)	437
<i>Тема 18.</i> Индикация возбудителя сальмонеллеза	443
<i>Тема 19.</i> Индикация возбудителя туберкулеза	450
<i>Тема 20.</i> Индикация возбудителя бруцеллеза	455
<i>Тема 21.</i> Индикация возбудителя сибирской язвы	462
<i>Тема 22.</i> Индикация патогенных кокков	468
Словарь терминов и определений	477
Литература	490

*Рауис Госманович ГОСМАНОВ
Альберт Камилович ГАЛИУЛЛИН
Али Харисович ВОЛКОВ
Альфия Исламовна ИБРАГИМОВА*

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Издание второе, стереотипное

Зав. редакцией ветеринарной
и сельскохозяйственной литературы *А. С. Копылова*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.10.953.П.1028
от 14.04.2016 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
196105, Санкт-Петербург, пр. Ю. Гагарина, д. 1, лит. А.
Тел./факс: (812) 336-25-09, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

Подписано в печать 16.12.16.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108^{1/32}.
Печать офсетная. Усл. п. л. 26,04. Тираж 100 экз.

Заказ № 350-16.

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленного оригинал-макета
в ПАО «Т8 Издательские Технологии».
109316, г. Москва, Волгоградский пр., д. 42, к. 5.

ГДЕ КУПИТЬ

ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ:

Для того, чтобы заказать необходимые Вам книги,
достаточно обратиться в любую из торговых компаний
Издательского Дома «ЛАНЬ»:

по России и зарубежью

«ЛАНЬ-ТРЕЙД»

РФ, 196105, Санкт-Петербург, пр. Ю. Гагарина, 1

тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82

тел./факс: (812) 412-54-93

e-mail: trade@lanbook.ru

ICQ: 446-869-967

www.lanbook.com

пункт меню «Где купить»

раздел «Прайс-листы, каталоги»

в Москве и в Московской области

«ЛАНЬ-ПРЕСС»

109263, Москва, 7-ая ул. Текстильщиков, д. 6/19

тел.: (499) 178-65-85

e-mail: lanpress@lanbook.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае

«ЛАНЬ-ЮГ»

350901, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1

тел.: (861) 274-10-35

e-mail: lankrd98@mail.ru

ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:

интернет-магазин

Издательство «Лань»: <http://www.lanbook.com>

магазин электронных книг

Global F5

<http://globalf5.com/>