

Х.Б. Юнусов, Д.Д. Алиев, Ж.С. Киркимбаева

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ



учебное пособие

Самаркандского государственного университета ветеринарной
медицины, животноводства и биотехнологии

Некоммерческое акционерное общество
«Казахский национальный аграрный университет»

Х.Б. Юнусов, Д.Д. Алиев, Ж.С. Киркимбаева

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

учебное пособие

для студентов, обучающихся по образовательной программе
«Ветеринарная медицина», «Ветеринарная санитария»

Издательско-полиграфический центр
Самаркандского государственного университета ветеринарной
медицины, животноводства и биотехнологий, 2024

УДК: 579.62:614.9

ББК 48.4:48.47

Х.Б. Юнусов Д.Д. Алиев Ж.С. Киркимбаева. Ветеринарная микробиология и иммунология. Учебное пособие. – Самарканд, Издательско-полиграфический центр Самаркандского государственного университета ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологий, 2024, 296 с.

Рекомендовано Министерством высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан (приказ № 485 от 27.12.2024 г.) в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Ветеринарная медицина», «Ветеринарная санитария».

Рецензенты:

1. Заманбеков Н.А. – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры клинической ветеринарной медицины КазНАИУ
2. Салимов И.Х. – Заведующий лабораторией Иммунологии и биотехнологии научно исследовательского института ветеринарии, доктор ветеринарных наук.

В учебном пособии в краткой форме представлены наиболее значимые вопросы ветеринарной микробиологии и иммунологии: современная классификация бактерий, физиология, генетика и экология микроорганизмов, патогенез инфекционных заболеваний, методы их диагностики, специфические препараты для профилактики и лечения. Рассмотрены вопросы организации и функционирования иммунной системы, формирования иммунопатологий и методы их коррекции. В последней главе описаны классические микробиологические методы исследований, которые позволят студентам получить необходимые практические навыки по работе с микроорганизмами. Особенность и своеобразие данного пособия – в изложении материала в простой и доступной форме. Вопросы в конце каждой темы позволят студентам проверить степень освоения материала.

ISBN: 978-9910-8603-3-1

Содержание

Введение

РАЗДЕЛ I. Общая микробиология

1. История развития микробиологии.....	7
2. Классификация и номенклатура микроорганизмов	12
3. Прокариоты: морфология и биология бактерий.....	14
4. Особенности морфологии и биологии хламидий, риккетсий и актиномицетов.....	23
5. Эукариоты. Особенности морфологии и биологии микроскопических грибов.....	28
6. Физиология микроорганизмов: питание бактерий и дыхание бактерий	35
7. Рост и размножение бактерий.....	48
8. Действие физических, химических, биологических факторов на микроорганизмы	52
9. Распространение микроорганизмов в природе (почве, воздухе и воде)	69

РАЗДЕЛ II. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

10. Типы биотических взаимоотношений микроорганизмов. Учение об инфекции. Понятие об инфекционном процессе и инфекционной болезни. Патогенность и вирулентность.....	76
11. Иммуитет. Виды иммунитета. Врожденный (неспецифические) факторы защиты организма	90
12. Иммунная система организма. Система Т и В-лимфоцитов и макрофагов.	97
13. Адаптивный (специфический) иммунитет. Механизм иммунного ответа Антигены, антитела.	104
14. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний. Практическое использование феномена иммунитета. Вакцины. Сыворотки крови. Аллергены. Диагностикумы.....	130

РАЗДЕЛ III. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

15. Возбудитель сибирской язвы	140
16. Возбудитель туберкулеза	151
17. Возбудитель бруцеллеза	159
18. Возбудители стафилококковых инфекций.....	172
19. Возбудители стрептококковых инфекций.....	182
20. Возбудители пастереллеза.....	188
21. Возбудители листериоза.....	197
22. Возбудитель лептоспироза	203
23. Возбудители анаэробных инфекций животных.....	209
24. Возбудители колибактериоза.....	232
25. Возбудители сальмонеллеза.....	239

РАЗДЕЛ IV. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

26. Устройство микроскопа и микроскопическая техника	247
27. Основы культивирования микроорганизмов.....	249

28. Приготовление препаратов из твердых и жидких бактериальных культур, простые способы окрашивания, исследования на подвижность микроорганизмов	252
29. Сложные методы окраски	259
30. Методы культивирования аэробных микроорганизмов Методы получения чистых культур микроорганизмов.....	266
31. Методы культивирования анаэробных микроорганизмов. Способы создания анаэробноза. Микрофлора почвы.	270
32. Определение микрофлоры воздуха	273
33. Микрофлора воды. Определение ОМЧ, коли-титра и коли-индекса воды.....	275
34. Микрофлора кормов и продуктов животного происхождения.....	281
35. Серологические исследования. Виды серологических реакций.....	283
Литература.....	293

Введение

Учебное пособие «Ветеринарная микробиология и иммунология» предназначено для студентов, обучающихся на факультет ветеринарии и получающих квалификацию ветеринарных врачей.

В учебном пособии студенты могут ознакомиться с основными группами бактерий животных и птиц, составляющих особое царство живых существ Procariotae, рассмотреть особенности их биологических свойств, особенностей роста и размножения, получить представление о наиболее интересных представителях данной группы, показать основные направления и перспективы развития микробиологической науки.

Ветеринарная микробиология и иммунология делится на два раздела; общая микробиология и иммунология; частная микробиология.

В разделе «Общая микробиология и иммунология» освещаются вопросы изучает патогенные для животных микроорганизмы и рассматривает морфологию и физиологию патогенных микроорганизмов, то есть осуществляет микроскопические и другие виды исследований, изучает обмен веществ, питание, дыхание, условия роста и размножения, генетические особенности; роль микроорганизмов в этиологии и патогенезе инфекционных болезней; основные клинические проявления и распространенность вызываемых заболеваний; специфическую диагностику, профилактику и лечение инфекционных заболеваний; экологию патогенных микроорганизмов.

История ветеринарной микробиологии и вирусологии связана с именами выдающихся ученых, таких как А. Левенгук, Р. Кох, Э. Дженнер, Л. Пастер, И.И. Мечников, П. Эрлих, М.В. Бейерник, Ф.М. Бернет, Д.И. Ивановский, Н.Ф. Гамалея и др. Значительный вклад в развитии микробиологии и вирусологии в области медицины и ветеринарии в Казахстане и Узбекистане внесли такие ученые, как Х. Жуматов, С. Каримов, И.Х.

Шуратов, И.С. Сайкович, И.А. Буланов, К.Н. Бучнев, Б.А. Матвиенко, Б.Т. Толысбаев, обладатель ордена «Парасат» К.Б. Бияшев, академики Н.П. Иванов, Т.С. Сайдуллин, Ш.Т. Расулов, А.М. Ахмедов, Н.Г. Шатохин, М.П. Парманов, Б. Ерматов, Х.К. Бурханова, И.К. Икрамова и многие другие.

РАЗДЕЛ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

1. История развития микробиологии

Этапы развития микробиологии

Историю развития микробиологии можно разделить на 5 этапов.

1. *Эмпирический (описательный) период* — 6–5 тыс. лет до нашей эры — XVI в. н. э. Человек пользовался плодами деятельности микроорганизмов (виноделие, хлебопечение, сыроделие, выделка кож), не зная об их существовании. В те времена верили, что болезни посылаются злыми духами или с помощью колдовства. Гиппократ (460 г. до н. э. — 370 г. до н. э.) полагал, что болезни людям посылают не боги, а возникают они по разным, вполне естественным, причинам. Он делил последние на два класса: общие (вредные влияния климата, почвы, наследственности) и личные (условия жизни и труда, питания, возраст). Наблюдая за течением болезней, он придавал серьезное значение периодам болезней, особенно лихорадочных, и предполагал, что многие болезни вызываются какими-то посторонними невидимыми причинами, имеющими живую природу и назвал их «миазмы». Автор обширного собрания из семи книг «Эпидемии». Итальянский врач Дж. Фракасторо (1546) также предполагал живую природу агентов инфекционных заболеваний. Он считал, что каждая болезнь вызывается своим «контагием», для предохранения от болезней рекомендовал изоляцию больного, карантин, ношение масок, обработку предметов уксусом.

2. *Морфологический период* — конец XVII — середина XIX в. открытие мира микроорганизмов, описание их внешнего вида, опыты по самозаражению с целью доказать инфекционную природу многих заболеваний. Левенгук Антони Ван (1632–1723) — Нидерландский натуралист, один из основоположников микроскопии. Торговал полотном в мануфактурной лавке в Амстердаме, в свободное время увлекался шлифованием линз. Изготовленные линзы он вставлял в металлическе держатели с прикрепленной к ним иглой для насаживания объекта наблюдения (1675 г. — первый микроскоп Левенгука). Всего за свою жизнь Левенгук изготовил около 250 линз со 150–300-кратным увеличением. При помощи таких «микроскопов» Левенгук впервые

наблюдал и зарисовал бактерии (1683), простейших (1675), отдельные растительные и животные клетки. В 1680 г. стал членом Королевского общества, в 1695 г. написал труд «Тайны природы, открытые А. Левенгуком». Несовершенство приборов и методов изучения микромира не способствовало быстрому накоплению научных знаний о микроорганизмах. Прямые доказательства роли микроорганизмов в возникновении инфекционных заболеваний были найдены в опытах по самозаражению материалами или культурами соответствующих возбудителей, взятыми от больного чумой (Д. Самойлович, В. Смирнов), холерой (М. Петенкофер, И. Мечников, Д. Заболотный, И. Савченко, Н. Гамалея), сыпным тифом (Г. Минх, О. Мочутковский), полиомиелитом (М. Чумаков), гепатитом А (М. Балоян).

3. *Физиологический (пастеровский) период* — конец XVIII — начало XX вв. Начало научной микробиологии: открыто большинство возбудителей инфекционных заболеваний, вирусы, разработана микробная концепция болезней, изучена жизнедеятельность микробной клетки. Английский врач Эдвард Дженнер (1749–1823) 14 мая 1796 г. предложил метод вакцинации. В эксперименте он доказал, что прививки людям возбудителя коровьей оспы из содержимого пустул на вымени больных коров предохраняют от заражения натуральной оспой. Результаты исследования он обобщил в статье «Исследование причин и действий коровьей оспы» (1798). С эмпирического открытия Дженнером вакцины против оспы, задолго до открытия самих вирусов, началась борьба с вирусными инфекциями. Французский ученый Луи Пастер (1822–1895) — член Парижской академии наук, Французской медицинской академии, основоположник современной микробиологии и иммунологии, биотехнологии. Опроверг теорию самозарождения микроорганизмов (1860). Доказал, что брожение не является химическим процессом, а его вызывают микроорганизмы (1861). Изобрел метод пастеризации, благодаря чему были побеждены болезни вина и пива, порча молочнокислых продуктов. Открыл возбудителей болезней шелковичных червей, вина и пива. Доказал формирование искусственного иммунитета (1870), открыл патогенные микроорганизмы (стафилококк, пневмококк, клостридии). Разработал принцип аттенуации, создал живые вакцины против куриной холеры (1879), сибирской язвы (1881), бешенства (1885).

Открыл явление анаэробноз. Ввел методы антисептики, стерилизации сухим жаром. В 1883 г. создал первый научно-исследовательский институт микробиологии - Институт Пастера. Немецкий микробиолог Роберт Кох (1843-1910) - один из основоположников современной бактериологии и эпидемиологии, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1884). Ему принадлежат труды по выявлению возбудителей инфекционных болезней и разработке методов борьбы с ними. Кроме этого, ученый сформулировал критерии этиологической связи инфекционного заболевания с микроорганизмом (триада Генле-Кох: выделить микроорганизм от больного, получить чистую культуру, заразить ею лабораторное животное и наблюдать у него развитие схожей клинической картины). Впервые выделил чистую культуру возбудителя сибирской язвы, доказал ее способность к спорообразованию, открыл холерный вибрион (запятая Коха) и туберкулезную палочку (палочка Коха). Предложил способы дезинфекции и стерилизации текучим паром. Ввел в практику метод выделения чистых культур на твердых питательных средах (агар-агаре, желатине, свернутой сыворотке), способы окраски бактерий анилиновыми красителями, иммерсионный объектив, способ микрофотографии. Лауреат Нобелевской премии 1905 г. Дмитрий Иосифович Ивановский (1864-1920). 12 февраля 1892 г. на заседании Российской академии наук он сообщил, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус. Эту дату можно считать днем рождения вирусологии, а Д. И. Ивановского — ее основоположником. Вирусы мозаичной болезни табака удалось впервые увидеть только в 1939 г. в электронный микроскоп.

4. *Иммунологический* — начало – середина XX в. Илья Ильич Мечников (1845–1916) — российский биолог и патолог, один из основоположников сравнительной патологии, эволюционной эмбриологии, иммунологии (автор клеточной теории иммунитета), создатель научной школы, член-корреспондент (1883), почетный член (1902) Петербургской АН. С 1888 г. работал в Пастеровском институте в Париже. Совместно с Н. Ф. Гамалеем основал первую в России бактериологическую станцию (1886). Открыл явление фагоцитоза (1882), изложил фагоцитарную теорию иммунитета в трудах «Невосприимчивость в инфекционных болезнях» (1901). Ему принадлежит цикл работ, посвященных микробиологии и

эпидемиологии холеры, чумы, брюшного тифа, туберкулеза; совместно с Э. Ру впервые экспериментально вызвал сифилис у обезьян (1903). Создал теорию происхождения многоклеточных организмов. Разработал учение о микробном антагонизме. Много внимания в своих трудах уделял проблеме старения. Урна с прахом Мечникова, согласно его воле, хранится в библиотеке Пастеровского института. Немецкий врач и бактериолог Пауль Эрлих (1854–1915) — почетный член Немецкого химического общества, автор гуморальной теории иммунитета. Открыл антитоксические антитела, разработал метод определения активности антитоксических сывороток. В 1896 г. основал и возглавил Институт по изучению и контролю сывороток. Открыл тучные клетки, разработал способ окрашивания туберкулезных бактерий. Является основоположником химиотерапии инфекционных заболеваний. Проводил эксперименты по лечению сифилиса органическими соединениями мышьяка, индукции злокачественных опухолей у животных. В 1908 г. И. Мечникову и П. Эрлиху присуждена Нобелевская премия. В последующей многолетней и плодотворной дискуссии между сторонниками фагоцитарной и гуморальной теорий были раскрыты многие механизмы иммунитета. Следующим важным этапом в развитии микробиологии стало открытие антибиотиков. В 1929 г. А. Флеминг открыл пенициллин, и началась эра антибиотикотерапии, приведшая к революционному прогрессу медицины. В дальнейшем выяснилось, что бактерии приспосабливаются к антибиотикам, а изучение механизмов лекарственной устойчивости привело к открытию плазмид. Г. Домагк обосновал антибактериальное действие сульфаниламидных препаратов и ввел их в лечебную практику (1932). Борис Яковлевич Эльберт (1890–1963) — МГМИ (1923), профессор и заведующий кафедрой, директор Белорусского государственного санитарно-бактериологического института, лауреат Государственной премии. Время деятельности — 20–60-е гг. XX в. Организовал производство лечебно-диагностических сывороток, питательных сред. Ученому принадлежат работы по клебсиеллам, микобактериям, лептоспирам, возбудителям тифов и натуральной оспы. Исследовал туляремию и противотуляремийный иммунитет, в соавторстве с Гайским разработал вакцину против туляремии. Кафедрой микробиологии,

вирусологии, иммунологии МГМИ/БГМУ заведовали: в 1962–1988 гг. — доктор медицинских наук, профессор Алексей Петрович Красильников, в 1988–2005 гг. — доктор медицинских наук, профессор Леонид Петрович Титов, с 2005 г. — кандидат медицинских наук, доцент Татьяна Александровна Канапкова.

5. *Молекулярно-генетический (современный)* — с середины XX в.: широкое использование молекулярных методов исследования. Этому способствовали важнейшие открытия в области молекулярной биологии и генетики. В опытах на бактериях была доказана роль ДНК в передаче наследственных признаков. Выяснение принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установление универсальности генетического кода позволило лучше понимать молекулярно-генетические закономерности, свойственные высокоорганизованным организмам. Расшифровка генома кишечной палочки сделала возможным конструирование и пересадку генов. Генная инженерия создала новое направление — биотехнологию, с помощью которой получены рекомбинантные микроорганизмы, новые вакцины и диагностические препараты. Расшифрована молекулярно-генетическая организация многих вирусов и механизмы их взаимодействия с клетками, механизмы вирусного канцерогенеза. Разработан метод культур клеток. Открыт провирус, вириды и прионы. В современном понимании иммунология — наука, изучающая механизмы защиты организма от всего генетически чужеродного, поддержание структурной и функциональной целостности организма. Иммунология включает ряд специализированных направлений: иммуноморфологию, иммуногенетику, иммунологию онтогенеза, трансплантационную иммунологию, иммунопатологию, иммуногематологию, онкоиммунологию, вакцинологию и прикладную иммунодиагностику. Открыты новые антигены (опухолевые, ГКГС). Расшифровано строение антител, разработана клонально-селекционная теория иммунитета. Созданы гибридомы и получены моноклональные антитела. Изучены многие виды иммунодефицитов, открыты иммуномодуляторы. Разработаны новые способы диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний (ИФА, РИА, иммуноблоттинг, гибридизация нуклеиновых кислот, ПЦР). Появляются новые данные об открытии инфекционных агентов — возбудителей «соматических»

заболеваний (язвенная болезнь желудка, гастрит, инфаркт миокарда, отдельные формы бронхиальной астмы, шизофрения и др.). Появилось понятие о новых и возвращающихся инфекциях. Пример реставрации старых патогенов — мультирезистентные микобактерии туберкулеза. Среди новых патогенов — вирусы геморрагических лихорадок, ВИЧ, легионеллы, бартонеллы, эрлихии, хеликобактер, хламидии. Сегодня микробиология, вирусология и иммунология — одно из ведущих направлений биологии и медицины, интенсивно развивающееся и расширяющее границы человеческих знаний.

Контрольные вопросы:

1. А. Левенгук и его открытия
2. Л. Пастер и его открытия
3. Р. Кох и его открытия
4. И.И. Мечников и его открытия
5. П. Эрлих и его открытия
6. А. Флеминг и его открытия
7. Б. Я. Эльберт и его открытия

2. Классификация и номенклатура микроорганизмов

Систематика как наука занимается проблемами классификации, номенклатуры и идентификации организмов. Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы. Номенклатура дает названия отдельным группам и микроорганизмам, принадлежащим к ним. Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании конкретных признаков. В микробиологии часто пользуются термином «штамм» и «клон». Штамм — это более узкое понятие, чем вид. Обычно штаммами называют различные культуры микроорганизмов одного и того же вида. Штаммы одного вида могут быть достаточно близкими по своим свойствам или различаются по отдельным признакам. В то же время свойства разных штаммов не выходят за пределы вида. Штаммы одного вида, различающиеся по антигенным характеристикам, называют серотипами (серовариантами - сокращенно сероварами), по чувствительности

к специфическим фагам- фаготипами, биохимическим свойствам- хемоварам, по биологическим свойствам- биоварам и т.д.

Колония - видимая изолированная структура при размножении бактерий на плотных питательных средах, может развиваться из одной или нескольких родительских клеток. Если колония развилась из одной родительской клетки, то потомство называется клоном.

Второй подход к систематике основан на учете признаков, удобных с точки зрения практики. Это искусственная, или традиционная, классификация. Она чаще всего заранее подчинена конкретным задачам. При такой классификации признаки, определяющие принадлежность организма к той или иной таксономической единице, часто выбираются произвольно. Иногда микроорганизмы объединяются в группы на основании одного ведущего признака. Поэтому группы микроорганизмов, классифицированные по данной систематике, могут иметь большое практическое значение, но не соответствуют естественной классификации. Искусственная классификация предназначена для определения той группы организмов, которая интересует исследователя. Искусственная классификация положена в основу Определителя Берджи (1974).

Одной из причин, затрудняющей классификацию микроорганизмов, является отсутствие точно установленных критериев, служащих для определения вида. По аналогии с систематикой высших организмов в микробиологии принято считать основной систематической единицей вид исходя из того, что под этим названием объединяется группа микроорганизмов, наделенная общими признаками и происходящая от общего предка.

В настоящем учебнике приведено описание наиболее важных групп микроорганизмов в соответствии с последним, девятым изданием (1984) Определителя бактерий Д.Х. Берджи.

Описание и характеристика водорослей и простейших обычно приводятся в курсе биологии, паразитологии. Подробные сведения о систематике грибов даны в разделе морфологии микроорганизмов.

Контрольные вопросы:

1. Понятие о систематике микроорганизмов
2. Классификация и номенклатура микробов

3. Что такое «номенклатура микроорганизмов»?
4. Что такое «штамм», «серотип», «колония», «клон»?
5. Отличительные критерии естественной классификации от искусственной
6. Место определителя бактерий Д.Х. Берджи в микробиологии

3. Прокариоты: морфология и биология бактерий

Прокариоты — организмы, состоящие из клеток, которые не имеют клеточного ядра или любых мембранных органелл. Это означает, что генетический материал ДНК у прокариот не связан в ядре. Кроме того, ДНК прокариот менее структурирована, одноконтурная. Большинство прокариот состоят только из одной клетки (одноклеточные), но есть несколько и многоклеточных.

Группа прокариотов, клетки которых обладают ригидной клеточной стенкой, имеющих форму прямой или изогнутой палочки, а также форму шара, делящихся бинарным путем, выделена как собственно группа бактерий. Многие из них имеют жгутики и способны образовывать споры, причем эта способность не является формой размножения клеток.

Термин «бактерии» происходит от слова *bacterion* - палочка. Размеры бактерий выражаются в микрометрах ($1\text{ мкм} - 10^{-6}\text{м}$).

Бактерии объединены в царство микроскопических организмов. Их можно увидеть только при увеличении микроскопа в 500-1000 раз. Бактерии распространены повсюду: в воздухе, в воде, в почве, в мёртвых телах и в живых организмах. Они были обнаружены даже на дне океана на глубине нескольких километров, в термальных источниках, температура воды которых достигает 90 градусов, в нефтеносных пластах, то есть они способны существовать в таких условиях, где другие живые организмы не встречаются вообще.

Строение бактериальной клетки обычно устроена наиболее просто по сравнению с клетками других живых организмов. Бактериальные клетки часто окружает капсула, которая служит защитой от внешней среды. Для многих свободноживущих бактерий характерно наличие жгутиков для передвижения, а также ворсинок.



Рис. 1. Строение прокариотической клетки. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В центре бактериальной клетки находится *нуклеоид* - ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной. *Цитоплазма* - сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения, *рибосомы* и другие элементы белоксинтезирующей системы, *плазмиды* (внеядерное ДНК), *мезосомы* (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении). *Цитоплазматическая мембрана* ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций - *барьерную* (создает и поддерживает осмотическое давление), *энергетическую* (содержит многие ферментные системы - дыхательные, окислительно - восстановительные, осуществляет перенос электронов), *транспортную* (перенос различных веществ в клетку и из клетки). *Клеточная стенка* - присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеоплазм и некоторых других не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Клеточная стенка состоит из двух слоев наружной - более пластичной, внутренней - ригидной, обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток.

Для выведения веществ, в том числе факторов патогенности, в окружающую среду используются системы секреции. Клеточная

стенка бактерий обычно содержит *пептидогликан*. От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий - отношение к окраске по Граму. В соответствии с ним выделяют две большие группы - грамположительные ("+") и грамотрицательные (" - ") бактерии. Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с *генциановым фиолетовым* (окрашены в сине- фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет за счет докрасивания фуксином.

Формы бактерий. Отдельным видам бактерий с достаточным постоянством присущи определённые формы и размеры. По форме бактерий разделяются на три основные группы: *шаровидные*, или *кокковые*, *палочковидные* и *извитые*. Длина бактериальных клеток варьирует от 0,1-0,2 мкм (виды *Mycoplasma*) до 10-15 мкм (виды *Clostridium*), толщина — от 0,1 до 2,5 мкм. Средние размеры бактерий — 2-3х0,3-0,8 мкм. Выделяют три основные формы бактерий — *шаровидные* (или *овальные*), *палочковидные* (цилиндрические) и *извитые* (спиралевидные), хотя известны и бактерии, имеющие иную форму (например, нитевидную, треугольную или звёздчатую). Подавляющее большинство бактерий, вызывающих заболевания человека и животных, имеют шаровидную (кокки) и палочковидную формы.

Кокки (*kokkos* – зерно) имеют округлую форму, диаметр их 1-2 мкм. В зависимости от расположения клеток после деления кокков различают ряд групп: **микрококки** (*micros* – малый) — клетки располагаются поодиночно; **диплококки** (*diplos* – двойной) — клетки не разъединяются, а остаются связанными по две; **стрептококки** (*streptos* – цепочка) — клетки образуют цепочки разной длины. Все эти морфологические группы имеют место при правильном делении клеток в одной плоскости. Однако кокки могут делиться в нескольких плоскостях и направлениях. При делении кокков в различных направлениях возникают скопления клеток, напоминающие гроздь винограда. Это **стафилококки** (*staphyle* - гроздь). Деление кокков в двух взаимно перпендикулярных направлениях приводит к образованию **тетракокков** (*tetra* – четыре). При одновременном делении кокков в трех плоскостях получают пакеты из восьми кокков в

виде тюков кубической формы. Это характерно для *сарцин* (*sarcin* — связка, тюк). Отдельные представители кокков имеют полукруглую форму клеток. Это пневмококки, менингококки и гонококки. Форма пневмококков овальная, напоминающая пламя свечи, клетки соединены попарно широкими основаниями. Менингококки и гонококки имеют форму бобов или кофейных зерен, клетки соединены по две вогнутыми сторонами.

Кокковые формы, за исключением *Sarcinaureae* (мочевой сарцины), не образуют спор, неподвижны, широко распространены в природе. Многие из них патогенны и являются возбудителями воспалительных процессов (пневмококки, менингококки, гноеродные стрептококки и стафилококки), другие — непатогенные — вызывают, например, молочнокислое брожение (*Str. lactis*, *Str. cremoris*).

Палочкообразные. Обычно термин "бактерия" подразумевает все прокариоты, а в самом деле бактерия-это палочкообразные микробы, которые не являются спорообразующими. Спорообразующие бактерии бациллы (лат. *bacillus*, палочка; если спор не превышает размер клеток) и клостридии (греч. *Kloster*, яичник; объем спор превышает объем клетки, и клетка становится похожей на веретенку). Палочкообразные бактерии (монобактерии), при рассеивании в мазке и раздельном рассеивании в мазке, при расположении вдоль одной линии двустворимой диплобактерии называются стрептобактериями, при расположении в цепях различной длины. Оба конца бактерий имеют острый (разновидности *Fusobacterium*), прямоугольный (*Bacillus anthracis*) или овальный (разновидности *Escherichia*). Также бактерии иногда могут быть похожи даже на шарообразные. Палочковидные бактерии (бациллы, клостридии) Термином «бактерия» обозначают в широком смысле всех представителей царства прокариотов, а в узком — палочковидные спорообразующие бактерии. Спорообразующие палочковидные бактерии подразделяют на бациллы [от лат. *bacillus*, палочка] и клостридии [от греч. *kloster*, веретено]. Это деление было основано на способности центрально расположенных спор клостридии деформировать материнскую клетку, придавая им форму веретена. Позднее были открыты виды клостридии, споры которых располагаются на концах клетки, но это название закрепилось за отдельным видом. Споры бацилл не деформируют

клетки. Размеры палочковидных бактерий могут быть менее 1 мкм (например, виды *Brucella*) либо превышать 3 мкм (например, виды *Clostridium*). По толщине они могут быть тонкими (виды *Mycobacterium*) или толстыми (виды *Clostridium*). Полюса клеток могут быть заострены (виды *Fusobacterium*), утолщены (виды *Corynebacterium*), «обрублены» под прямым углом (*Bacillus anthracis*) либо закруглены (виды *Escherichia*); иногда они могут принимать овоидную (*Yersinia pestis*) или кокковидную форму (*Francisella tularensis*). В мазках палочковидные бактерии могут располагаться одиночно и беспорядочно (монобактерии); попарно по одной линии (диплобактерии) и в виде цепочек различной длины (стрептобактерии).

По химическому составу микроорганизмы мало отличаются от других живых клеток. Значительную часть клетки составляет вода: 70—85% от общей массы. Значение воды в жизнедеятельности клетки огромно. В ней растворяются различные химические вещества, диссоциируют электролиты, формируются коллоиды. Поэтому микробы могут расти и размножаться только в питательных средах, содержащих воду. Сухой остаток микробной клетки составляет 15—30%. Из них 90—97% приходится на долю элементов — органогенов: углерода (50%), кислорода (30%), азота (12%), водорода (8%). Процент остальных зольных элементов, например натрия, калия, кальция, фосфора, железа, магния и др., составляет 3—10. Относительная плотность микробной клетки 1,055. Большинство микроорганизмов имеет отрицательный электрический заряд, а спирохеты — положительный.

Органические вещества представлены в клетке в основном белками, углеводами, жирами, нуклеиновыми кислотами: ДНК и РНК. Общее количество органических веществ может значительно колебаться в зависимости от среды обитания (от 40 до 90%).

Белки составляют основную часть органических веществ в клетке (40—80%) и определяют важнейшие биологические свойства микроорганизмов. Это простые белки — протеины и сложные — протеиды. Белки построены из аминокислот, состав которых характерен для различных видов микроорганизмов. Большое значение имеют нуклеопротеиды, представляющие соединения белка с нуклеиновыми кислотами: ДНК и РНК.

Наряду с ними в клетке встречаются гликопротеиды, липопротеиды, хромопротеиды.

Углеводы являются наиболее вариабельной частью клетки (10—30%), и состав их различен не только у разных видов, но даже у штаммов бактерий. Он зависит от возраста и условий развития микробов. Бактерии содержат простые углеводы — моно- и дисахариды, комплексные углеводы — полиозиды и большие углеводные макромолекулы — полисахариды.

Углеводы выполняют в клетке пластическую роль, имеют большое значение как источник энергии, необходимой для обменных процессов. У некоторых микроорганизмов, например пневмококков, полисахаридный состав капсул настолько специфичен, что определение его позволяет разграничить отдельные типы внутри вида. В настоящее время раскрыты и изучены полисахаридные комплексы большинства кишечных бактерий, менингококков, пневмококков и многих других микроорганизмов.

Большое значение имеют также комплексные углеводы, содержащие азот. Например, глюкозамин, входящий в состав клеточной стенки бактерий, определяет ее форму.

Липиды состоят в основном из нейтральных жиров, фосфолипидов и свободных жирных кислот. Количество их зависит от возраста культуры и вида микроорганизма. Например, у микобактерий туберкулеза количество липидов достигает 40%. Фосфолипиды являются составной частью цитоплазматической мембраны. Липиды также входят в комплекс веществ, образующих клеточные стенки бактерий, особенно грамотрицательных, и определяющих токсические свойства микроорганизмов. Количество-липидов в клетке колеблется от 1 до 40%

Нуклеиновые кислоты — дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) являются важнейшей составной частью клетки. В ДНК бактерий зашифрована вся наследственная информация клетки, а РНК участвует в процессах считывания этой информации, передачи и синтеза белка. Количество нуклеиновых кислот достигает 5—30%.

В состав бактерий входят также сложные небелковые азотистые вещества: различные пурины, полипептиды, аминокислоты.

Минеральный состав микроорганизмов различен и меняется в зависимости от состава питательной среды. Основные элементы, необходимые для жизнедеятельности клетки, — натрий, калий, фосфор, кальций, магний, железо, медь, сера, хлор, кремний. Фосфор, например, входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, многих коферментов. Некоторые фосфорорганические соединения являются своеобразными аккумуляторами энергии, например аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Железо — обязательная часть дыхательных ферментов клетки. Медь содержится в некоторых дыхательных ферментах. Натрий играет роль в поддержании осмотического давления в клетке.

Средние значения веществ в химии бактериальных клеток и клеток млекопитающих

Компоненты	Общий вес (%)	
	Бактерии	Клетки млекопитающих
Вода	70	70
Неорганические ионы	1	1
Белок	15	18
РНК	6	1,1
ДНК	1	0,25
Фосфолипиды	2	3
Другие липиды	-	2
Полисахариды	2	2
Общий объем клетки	$2 \times 10^{-12} \text{ см}^3$	$4 \times 10^{-9} \text{ см}^3$

Спорообразование бактериями и их стадии. Некоторые бактерии обладают способностью образовывать споры. Это относится, прежде всего, к палочковидным формам; у кокков спорообразование встречается редко, а для вибрионов и спирилл оно отсутствует. Процесс спорообразования заключается в том, что в определенном месте бактериальной клетки цитоплазма начинает сгущаться, затем этот участок покрывается довольно плотной оболочкой. Остальная часть клетки постепенно разрушается. Таким образом, бактериальная клетка в течение нескольких часов превращается в спору.

В бактериальной клетке спора может располагаться центрально, на конце или занять промежуточное положение (субтерминальное). Споры различных видов имеют

неодинаковую форму. Они могут быть шаровидными, овальными. Иногда диаметр спор превышает толщину клетки, и это приводит к ее деформации — вздутию.

Эти особенности спорообразования у различных бактерий являются довольно постоянными признаками и часто используются в диагностике, т. е. при распознавании бактерий. Спорообразование стимулируется наступлением неблагоприятных для развития условий, обеднением питательной среды.

Жизненные процессы обменного характера, например, дыхание, хотя и происходят в спорах, но, крайне замедленно.

Споры более устойчивы, чем вегетативные формы этих же бактерий, к действию проникающей радиации, ультразвука, высушиванию, замораживанию, разрежению, гидростатическому давлению, действию ядовитых веществ и др.

Споры некоторых бактерий остаются жизнеспособными даже после нахождения в течение 20 мин в кипящей концентрированной кислоте.

Устойчивость спор повышается при их предварительном обезвоживании.

Термостойкость спор можно объяснить сравнительно невысоким содержанием свободной воды в цитоплазме (по некоторым данным, всего 40 %) и относительно большим содержанием сухого вещества (в основном белка). Плотная, многослойная оболочка хорошо защищает споры от проникновения вредных веществ.

Благодаря способности к образованию спор, обладающих исключительно высокой устойчивостью к внешним воздействиям, спорообразующие бактерии остаются жизнеспособными при крайне неблагоприятных условиях.

Подавление жизнеспособности и уничтожение спорообразующих бактерий являются одной из основных практических задач консервной промышленности, переработки и хранения сельскохозяйственных продуктов.

Споры являются особой, устойчивой формой существования бактерий, способствующей сохранению данного вида. Спорообразование у бактерий не связано с размножением, так как бактериальная клетка способна образовывать лишь одну спору.

Если споры попадают в благоприятные условия, каждая из них в течение нескольких часов превращается в обычную (вегетативную) бактериальную клетку. Вначале лопается оболочка споры, а затем в этом месте появляется проросток клетки, постепенно превращающийся в нормальную клетку. Прорастание длится несколько часов. В практике нередко приходится наблюдать так называемые «дремлющие» споры. Это те, которые отстают от общей массы в скорости прорастания и, сохраняя жизнеспособность в течение долгого времени, могут прорасти постепенно через продолжительные сроки, исчисляемые временем от нескольких суток до многих лет.

Способность к образованию спор учитывается в систематике бактерий, при выборе методов стерилизации пищевых продуктов, оборудования, инвентаря. Спорообразование может утрачиваться при частых пересевах бактерий на свежую среду, культивировании их при высоких температурах.

Среди бактерий есть *подвижные и неподвижные формы*. Большинство подвижных бактерий активно передвигается только в жидкой среде.

Движение бактерий осуществляется: С помощью *жгутиков*. Жгутики имеют палочковидные бактерии и некоторые извитые формы. Присутствие жгутиков, их расположение на поверхности бактерий являются для данного вида постоянными признаками и имеют диагностическое значение. Одни виды бактерий имеют один жгутик (*монотрихи*), у других жгутики располагаются пучками на одном или обоих концах клетки (*политрихи*), у третьих покрывают всю поверхность клетки (*перитрихи*). Длина жгутиков во много раз может превышать длину клетки бактерий, достигая 10–30 мкм и более. Поперечный размер жгутиков составляет 0,01–0,03 мкм. Бактерий могут передвигаться *путем скольжения*. Данный тип движения встречаются у бактерий, имеющих слизистый чехол. За счет слизи клетка скользит по поверхности и передвигается. За счет сокращения всей *ползания*. Такой тип движения осуществляется передвижение *путем* Некоторые бактерии для передвижения осуществляют спирохеты. слизи, и сами при этом отталкиваются, называется *рактивное движение*.

Контрольные вопросы:

1. Строение клетки прокариота
2. Основные группы микроорганизмов
3. Морфология бактерий
4. Строение бактериальной клетки
5. Химический состав бактерии
6. Споробразование бактериями и их стадии
7. Виды движения бактерий

4. Особенности морфологии и биологии хламидий, риккетсий и актиномицетов

Извитые бактерии подразделяют на две основные группы: вибрионы, спириллы и спирохеты. У вибрионов и сходных по форме бактерий изогнутость тела не превышает четверти оборота спирали (например, у кампилобактер). Спирохеты имеют изгибы, равные одному или нескольким оборотам спирали (например, возбудитель сифилиса).

Хламидии — сферические грамотрицательные бактерии, облигатно паразитирующие в клетках теплокровных организмов. Они значительно меньше, чем обычные шаровидные бактерии. Они не обладают цитохромами, не способны генерировать АТФ (используют энергодающие соединения АТФ, НАД в клетках хозяина). У хламидии известны две стадии жизненного цикла – в первой она может существовать вне клетки, а во второй стадии она уже живет в клетке, становясь абсолютным клеточным паразитом. Размножаются только внутри связанных с мембраной вакуолей в цитоплазме клеток человека, млекопитающих, птиц. Размножение происходит в ходе уникального цикла развития. Основными стадиями жизненного цикла хламидий являются:

Элементарные тельца - мелкие (0,2-0,5 мкм) шаровидные клетки, лишённые метаболической активности. Они являются инфекционным началом хламидий и обеспечивают их выживание во внеклеточной среде и заражение новых клеток. Ретикулярные тельца - более крупные (0,8-1,5 мкм), сферические образования, имеющие сетчатую структуру с тонкой клеточной стенкой и фибриллярным нуклеондом. Они вырастают из элементарных

тельцев внутри клеток, лишены инфекционности и, подвергаясь делению, обеспечивают репродукцию хламидий.

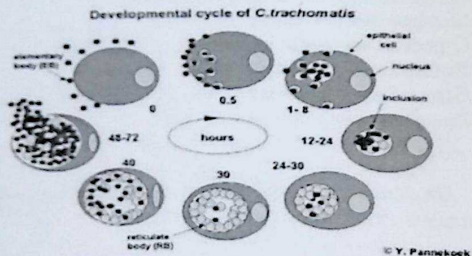


Рис.2. Жизненный цикл хламидий. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Методы исследования. Для микроскопического обнаружения тельцев включений (микроколоний) хламидий в инфицированных клетках (тканях) применяют различные методы окрашивания: Романовского-Гимзы, Маккиавелло и другие. При окрашивании по Романовскому-Гимзе они приобретают голубой или фиолетовый цвет.



Рис.3. Метод окрашивания хламидий по Романовскому-Гимзе. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Кроме того, хламидии хорошо видны и в неокрашенном состоянии при микроскопии влажных препаратов под стеклом с помощью фазово-контрастной оптической системы. В последнее

время наиболее часто используется прямая реакция иммунофлюоресценции, окраска акридин – ⁰⁰оранжевым.

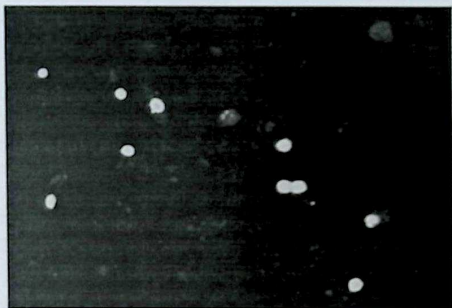


Рис.4. Прямая реакция иммунофлюоресценции хламидий.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Риккетсии - мелкие грамтрицательные, полиморфные бактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами. Морфология риккетсии может существенно меняться в зависимости от условий культивирования. Они могут быть палочковидными, нитевидными или иметь неправильную форму.



Рис.5. Морфология риккетсии. Займствовано из Интернет-ресурсов

Риккетсии способны к биосинтезу белка, но не могут самостоятельно получать макроэргические соединения, поэтому их можно назвать «энергетическими паразитами» клеток-эукариотов. Жизненный цикл риккетсий зависит от жизнедеятельности клетки-

хозяина и складывается из двух стадий: вегетативной и покоящейся (элементарные тельца). Риккетсии, находящиеся в вегетативной стадии активно размножаются путем бинарного деления и обладают активной подвижностью. Риккетсии покоящейся стадии (элементарные тельца) имеют сферическую форму и они не активны.

Методы исследования. Риккетсии слабо окрашиваются по методу Грама, хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе в сиреневый цвет на голубом фоне, по Морозову (методом серебрения) в черный цвет. Для дифференциации риккетсий применяется метод окраски, предложенный П.Ф. Здродовским. Риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и легко обнаруживаются на фоне голубой цитоплазмы и синего ядра клеток.



Рис.6. Окраска риккетсии по Романовскому-Гимзе.
Займствовано из Интернет-ресурсов

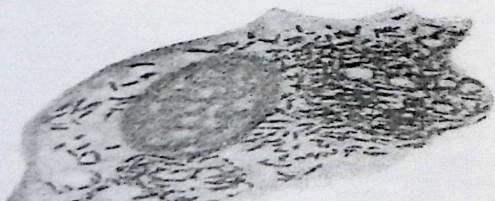


Рис.7. Метод окраски риккетсии по П.Ф. Здродовского.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Актиномицеты - формы бактерий, имеющие истинный, не имеющий перегородок мицелий. Мицелиальный (в виде ветвящихся нитей) рост этих грамположительных тонкие, прямые или слегка изогнутые длиной 1-3 мкм палочковидные бактерии. В процессе роста после деления не отделяются друг от друга образуя мицелиоподобные филаменты, цепочки длиной до 10-50 мкм. Это сходство усиливается вследствие наличия у высших форм актиномицетов наружных неполовых спор, которые называются конидиями.



Рис.8. Морфология актиномицетов. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В отличие от грибов, актиномицеты имеют прокариотическое строение клетки, не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, размножаются только бесполом путем. Актиномицеты сходны с бактериями, отличием от них является наличие в составе пептидогликана и таких углеводов как арабиноза, галактоза, ксилоза и мадуроса. У низших актиномицетов мицелий фрагментируется на типичные одноклеточные бактерии. Мицелий актиномицетов подразделяют на субстратный (в субстрате) и воздушный. К мицелиальным бактериям относят микобактерии, рода накардий и актиномицетов, несколько родов высших актиномицет.

Для актиномицетов характерно образование друз - плотных "зерен" в гное, представляющих собой беспорядочно переплетенные в центре нити мицелия с радиально отходящими на периферию колбовидно расширенными на концах "дубинками".



Рис.9. Друзы актиномицет в препарате из гноя. Заимствовано из Интернет-ресурсов

С некоторыми актиномицетами (например, стрептомицетами) связана способность выработки антибиотиков.

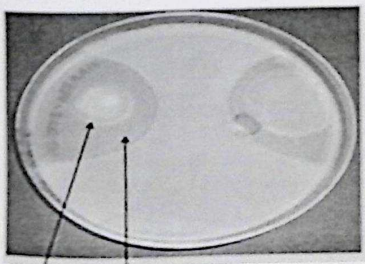


Рис.10. Продуцирование актиномицетами антибиотков. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Контрольные вопросы:

1. Морфология и биология хламидии. Методы исследования
2. Морфология и биология риккетсий. Методы исследования
3. Морфология и биология актиномицетов. Методы исследования

5. Эукариоты. Особенности морфологии и биологии микроскопических грибов

Развитие эукариотов (из прокариотов) произошло значительно позже с появлением кислорода в атмосфере и

рассматривается как гигантский скачок в эволюции организмов, проявившийся в усложнении структурной организации и морфологической дифференцировке.

Эукариотическая клетка отличается от прокариотической большими размерами и более сложным строением. Линейные размеры эукариотической клетки обычно составляют десятки мкм (у животных около 10–40 мкм, у растений 100–200 мкм). Основные структуры эукариотической клетки: цитоплазматическая мембрана, цитоплазма и ядро. Клетки эукариот содержат множество внутренних структур, выполняющих определенные функции. Эти структуры называются органеллами (органоидами).



Рис. 11. Строение эукариотической клетки. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ранее считали, что грибы занимают промежуточное положение между царствами растений и животных, так как ряд признаков сближает их как с растениями, так и с животными. В настоящее время грибы выделены в отдельное царство *Mycota*, которое насчитывает около 100 тыс. видов.

Исходя из строения вегетативного типа (мицелия), способов бесполого и полового размножения, химического состава оболочек и других признаков грибы делят на 6 классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, или сумчатые, базидиомицеты, дейтеромицеты, или несовершенные грибы.

К первому классу относятся хитридиомицеты (*Chytridiomycetes*). Это микроскопические одноклеточные грибы с несколькими ядрами. Хитридиомицеты мицелия не образуют, или он в зачаточном состоянии. Клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Их споры и половые клетки имеют на заднем конце по одному бичевидному жгутику. Размножение бесполое

(зооспорами) и половое. Хитридиомицеты — обитатели водоемов и почвы — широко распространены в природе. Эти грибы не собирают.

Ко второму классу относятся оомицеты (Oomycetes). Это микроскопические одноклеточные грибы с волокнистым слоевищем без перегородок и с двухжгутиковыми спорами, с характерными элементами бесполого размножения. Они ведут как сапротрофный, так и паразитический образ жизни в пресной воде или в почве. Некоторые виды — паразитируют на различных культурных растениях, вызывают заболевания рыб и икры. Эти грибы также не собирают.

К третьему классу относятся зигомицеты (Zygomycetes). У зигомицет мицелий хорошо развит, многоядерный, несептированный (низшие грибы). Размножаются неподвижными спорангиоспорами или конидиями, отмечается половой путь размножения. Эти грибы имеют хорошо развитые гифы без перегородок и неподвижные споры. Живут, главным образом, как сапротрофы в почве и на поверхности земли и разлагают органическое вещество на простейшие неорганические элементы. Они играют большую роль в образовании гумуса (перегноя).

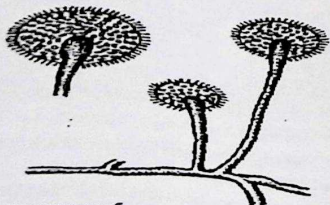


Рис. 12 Морфологические особенности - *Mucor*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Среди них значительное число видов сапротрофов, широко распространенных в почвах разных типов на экскрементах; многие виды развиваются на различных пищевых остатках и продуктах. Представителями этого класса являются грибы рода мукор (головчатая плесень). У мукора от одноклеточного мицелия отходят бесцветные спорангиеносцы, на верхушке которых развивается по одному спорангию. У животных и человека могут

вызывать мукоморикозы. Ряд видов — паразиты насекомых. Эти грибы не собирают.

Четвертому классу относятся сумчатые грибы **аскомицеты** (Ascomycetes), которые имеют хорошо развитые гифы с перегородками. Клетки гиф с одним ядром. Сумчатые грибы образуют различной формы плодовые тела, в которых на концах гифовых волокон образуются сумки с неподвижными спорами. Они представляют собой самый обширный класс грибов. Имеют сильно разветвленный, многоклеточный мицелий. Размножение происходит обычно при помощи конидий. Они могут размножаться половым путем — аскоспорами, которые образуются после слияния ядер половых клеток в сумке (аске). В аске образуется 2-8 аскоспор.

К аскомицетам относят рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Saccharomyces*. Широко распространены в природе, обитают в почве, органических субстратах, кормах, пищевых продуктах, вызывая их порчу. Имеются токсические виды, они способны вызывать микотоксикозы. Аскомицетами являются также съедобные грибы.

К роду *Aspergillus* относится широко распространенная в природе черная плесень *A. niger*. И хотя названный род относится к сумчатым грибам никаких эндоспор он не образует и размножается бесполом путем с помощью экзоспор или конидий. Мицелий аспергилл многоклеточный, септированный. От него поднимается одноклеточный конидиеносец, заканчивающийся булавовидным утолщением, на котором в форме струй воды из лейки располагаются отростки - стеригмы, отшнуровывающие наружные споры (экзоспоры) или конидии. Описываемая плесень получила также название леесной. Она широко распространена в природе и может поражать верхние дыхательные пути, органы зрения, слуха и пр.

Род *Penicillium* отличается от предыдущего тем, что конидиеносец у него многоклеточный, а стеригмы расположены в форме кисточки - кисточковая плесень. Довольно часто встречается в кормах, молочных продуктах, на влажных поверхностях. Некоторые виды пеницилловой плесени используются как продуценты пенициллина и кормовых антибиотиков.

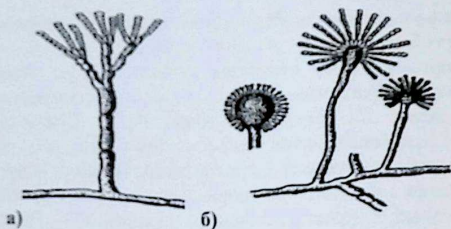


Рис. 13. Морфологические особенности грибов
а - *Penicillium*; б - *Aspergillus*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Род *дрожжей* (*Saccharomyces*) составляет одноклеточные микроорганизмы сферической, округлой формы размером 7-10 мкм. Структурно имеют двухконтурную оболочку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму. В ней четко оформлены цитоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, рибосомы, митохондрии, ядро (отграниченное от цитоплазмы трехслойными мембранами), лизосомы, вакуоли, а также зерна волютина, гликогена, липидов.

Пятый класс составляют базидиальные грибы или *базидиомицеты* (*Basidiomycetes*). Имеют хорошо развитые гифы с перегородками. В их клетки входит по два ядра. Характерный признак класса образование в гимении базидий, на которых экзогенно образуются неподвижные споры — *базидиоспоры*. Они живут как сапротрофы и очень редко как паразиты. К этому классу относится больше всего грибов, которые могут заинтересовать грибников. Большая часть грибов, описанных в нашей книге, относится как раз к этому классу.

Шестому классу относятся несовершенные грибы *дейтеромицеты* (*Deuteromycetes*). Они имеют разветвленные, многоядерные с перегородками гифы как у сумчатых или у базидиальных грибов. Бесполое размножение осуществляется половой процесс отсутствует. В связи с отсутствием полового размножения трудно определить к каким грибам относятся они, к сумчатым или базидиальным. Система несовершенных грибов не отражает их филогенетического сходства, и поэтому ее считают искусственной.

Грибы являются особыми растительными организмами, которые не имеют хлорофилла и не синтезируют органические вещества, а нуждаются в готовых органических веществах. Поэтому грибы развиваются на различных субстратах, содержащих питательные вещества. Некоторые грибы способны вызывать болезни растений (рак и фитофтора картофеля и др.), насекомых, животных и человека.

Клетки грибов отличаются от бактериальных наличием ядер и вакуолей и похожи на растительные клетки. Чаще всего они имеют форму длинных и ветвящихся или переплетающихся нитей - *гифов*. Из гифов образуется *мицелий*, или *грибница*. Мицелий может состоять из клеток с одним или несколькими ядрами или быть неклеточным, представляя собой одну гигантскую многоядерную клетку. На мицелии развиваются плодовые тела. Тело некоторых грибов может состоять из одиночных клеток, без образования мицелия (дрожжи и др.).

Грибы могут размножаться разными путями, в том числе вегетативным путем в результате деления гиф. Большинство грибов размножаются *бесполом* и *половым* путями при помощи образования специальных клеток размножения - *спор*. Споры, как правило, способны длительно сохраняться во внешней среде. Созревшие споры могут переноситься на значительные расстояния. Попадая в питательную среду, споры быстро развиваются в гифы.

Обширную группу грибов представляют *плесневые грибы*. Широко распространенные в природе, они могут расти на пищевых продуктах, образуя хорошо видные налеты разной окраски. Причиной порчи продуктов часто являются мукоровые грибы, образующие пушистую белую или серую массу. Мукоровый гриб ризопус вызывает «мягкую гниль» овощей и ягод, а гриб ботритис покрывает налетом и размягчает яблоки, груши и ягоды. Возбудителями плесневения продуктов могут быть грибы из рода пенициллиум.

Отдельные виды грибов способны не только приводить к порче продуктов, но и вырабатывать токсические для человека вещества — *микотоксины*. К ним относятся некоторые виды грибов рода аспергиллус, рода фузариум и др.

Полезные свойства отдельных видов грибов используют в пищевой и фармацевтической промышленности и других производствах. Например, грибы рода пенициллиум применяются

для получения антибиотика пенициллина и в производстве сыров (рокфора и камамбера), грибы рода аспергиллус — в производстве лимонной кислоты и многих ферментных препаратов.

Для приготовления препарата плесневых грибов очень осторожно (чтобы не разрушить органов спороношения) специальной иглой (можно препаровальной) или ботаническим пинцетом снимают кусочек пленки гриба и переносят его в каплю воды, предварительно нанесенную на предметное стекло. Препарат осторожно, слегка придавливая, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом с объективом 8X. При этом увеличении хорошо различается строение органов спороношения плесневых грибов. Для подробного изучения отдельных деталей строения (гиф, сумок и т.д.) препарат рассматривают с объективом 40X. При этом обязательно следует регулировать освещение с помощью диафрагмы для получения более четкого изображения рассматриваемых деталей.

Контрольные вопросы:

1. Строение клетки эукариота
2. Основные группы грибов
3. Отличительные особенности спор бактерий от спор грибов
4. В чем сходство и различия грибов с растениями, с животными?
5. Что такое «мицелий», «гифы»?
6. Какие признаки положены в основу классификации грибов?
7. Охарактеризуйте класс хитридиомикеты. Назовите наиболее важных представителей этого класса.
8. Охарактеризуйте класс оомицеты. Назовите наиболее важных представителей этого класса.
9. Охарактеризуйте класс зигомицеты. Назовите наиболее важных представителей этого класса.
10. Охарактеризуйте класс аскомицетов. Назовите наиболее важных представителей этого класса.
11. Охарактеризуйте класс дейтеромикетов. Какие из представителей

дейтеромицетов являются возбудителями порчи плодов и овощей?

12. Какие способы размножения грибов Вы знаете?

6. Физиология микроорганизмов: питание бактерий и дыхание бактерий

Питание микробов осуществляется путем диффузии через оболочку и мембрану растворенных в воде питательных веществ. Нерастворимые сложные органические соединения предварительно расщепляются вне клетки с помощью ферментов, выделяемых микробами в субстрат.

Потребности микроорганизмов в питательных веществах разнообразны, но независимо от потребностей в питательной среде должны содержаться все необходимые элементы, которые имеются в клетках микроорганизмов, причем соотношение органогенных элементов должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке. Источниками водорода и кислорода являются вода, молекулярный водород и кислород, а также химические вещества, содержащие эти элементы. Источниками макроэлементов являются минеральные соли (калий фосфорнокислый, магний сернокислый, железо хлорное и др.).

Источниками углерода и азота могут быть как органические, так и неорганические соединения.

В соответствии с принятой классификацией микроорганизмов по *типу питания* их разделяют на группы в зависимости источника углерода, источника энергии и источника электронов (природы окисляемого субстрата).

По способу питания микроорганизмы разделяют на аутотрофные и гетеротрофные. Для характеристики типов питания растений и животных введены термины «аутотрофный» и «гетеротрофный». *Аутотрофный* (от греческого *auto* – сам, *trophic* – питающийся) тип питания который присущ растениям; *гетеротрофный* (от греческого *hetero* – другой) тип присущ животным. *Аутотрофы* - способны синтезировать из неорганических веществ (в основном углекислого газа, неорганического азота и воды) органические соединения. В качестве источника энергии для синтеза эти микробы используют световую энергию (фотосинтез) или энергию окислительных

реакций (хемосинтез). *Гетеротрофы* - используют для питания в основном готовые органические соединения. Микробы, питающиеся органическими веществами отмерших животных или растительных организмов, называют *сапрофитами*. К ним относятся бактерии гниения, грибы и дрожжи. *Паратрофные* микроорганизмы, или паразиты, живут за счет питательных веществ живых клеток организма хозяина. К паратрофам относится большинство болезнетворных микробов. Различают четыре типа питания: *фотолитотрофия*, *фотоорганоотрофия*, *хемолитотрофия* и *хемоорганоотрофия*. Соответствующие названия имеют и микроорганизмы, обладающие этими типами питания.

К *фотолитотрофам* относятся сине-зеленые водоросли, фотосинтезирующие зеленые и серные пурпурные бактерии. Фотосинтезирующие бактерии для процессов синтеза используют энергию солнечного света. Подобно высшим растениям в цитоплазме клеток этих бактерий содержатся пигменты типа хлорофилла. Бактериальный хлорофилл по химической структуре весьма сходен с хлорофиллом растений.

К *фотоорганоотрофам* относятся несерные пурпурные бактерии, которые для восстановления углекислого газа могут использовать водород органических соединений. В отличие от серобактерий они являются факультативными анаэробами, нуждаются в витаминах, хорошо развиваются на органических средах. Причем развитие их может происходить как на свету, так и в темноте. Окисление субстрата происходит по циклу трикарбоновых кислот. Пурпурные бактерии используют органические вещества не только в качестве доноров водорода, но и как непосредственные источники углерода.

К *хемолитотрофам* относятся бактерии, которые способны ассимилировать углекислоту и синтезировать органические вещества за счет химической энергии, получаемой при окислении различных минеральных веществ: аммиака, нитритов, сероводорода, водорода и железа. В отличие от фотосинтеза, где используется энергия света, этот процесс получил название хемосинтеза. Хемосинтез открыт в 1887 г. С. Н. Виноградским у бесцветных серобактерий, затем у ряда других микроорганизмов.

К хемоорганотрофам относятся микроорганизмы, которые нуждаются в готовых органических соединениях. Источником энергии и источником водорода для них служат органические вещества. Это самая разнообразная и весьма многочисленная группа микроорганизмов. Они широко распространены в природе и играют огромную роль в разложении органических веществ. В качестве источников углерода хемоорганотрофы используют готовые органические соединения самой различной химической структуры.

Аутотрофные микроорганизмы («сами себя питающие») используют в качестве единственного источника углерода углекислоту, из которой могут синтезировать необходимые им углеродсодержащие соединения. К аутотрофному типу питания углеродом способны представители фотолитотрофов и хемолитотрофов.

Питание микроорганизмов осуществляется благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции.

Ферменты - это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов. В соответствии с катализирующими реакциями все ферменты разделяют на шесть классов:

Оксидоредуктазы - катализируют реакции окисления-восстановления.

Трансферазы - катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору.

Гидролазы - катализируют разрыв связей в субстратах с присоединением воды.

Лиазы - катализируют реакции разрыва связей в субстрате без присоединения воды или окисления.

Изомеразы - катализируют превращения в пределах одной молекулы (внутримолекулярные перестройки).

Лигазы (синтетазы) - катализируют присоединение двух молекул с использованием энергии фосфатных связей.

Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядоченно. Ферменты энергетического

обмена и транспорта питательных веществ локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных. Ферменты белкового синтеза связаны с рибосомами. Многие ферменты не связаны с определенными структурами клетки, а находятся в цитоплазме в растворенном виде.

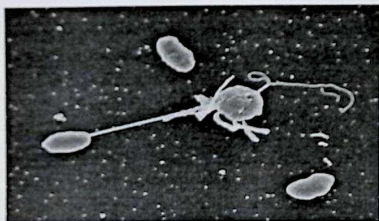


Рис.14. Anthony D'Onofrio. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Ферменты бактерий подразделяются на экзо- и эндоферменты. Эндоферменты функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена. Экзоферменты выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции микробной клеткой. К ним относятся гидролитические ферменты, играющие исключительно важную роль в питании микроорганизмов.

В зависимости от условий образования ферментов их разделяют на конститутивные и индуцибельные. Конститутивными называют ферменты, синтезируемые клеткой вне зависимости от субстрата, на котором развиваются бактерии. Например, ферменты гликолиза. Индуцибельные ферменты синтезируются только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. Он взаимодействует с репрессором, инактивирует его, в результате чего включается генетический аппарат клетки и начинается синтез соответствующего фермента. Индуцированный синтез ферментов идет, пока в среде присутствует индуктор. При этом ферменты синтезируются заново во всех клетках одновременно. Индукторами биосинтеза являются многие питательные вещества. К

индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов.

Известны также ферменты, которые получили название аллостерических. Кроме активного центра у них имеется регуляторный или аллостерический центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. *Аллостерическим* (от греч. *allos* - иной, чужой) он называется потому, что молекулы, связывающиеся с этим центром, по строению (стерически) не похожи на субстрат, но оказывают влияние на связывание и превращение субстрата в активном центре, изменяя его конфигурацию. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, называют аллостерическими эффекторами. Они влияют через аллостерический центр на функцию активного центра: или облегчают ее, или затрудняют. Соответственно аллостерические эффекторы называются положительными (активаторы) или отрицательными (ингибиторы).

Аллостерические ферменты играют важную роль в тонкой регуляции метаболизма бактерий. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

Некоторые ферменты, так называемые ферменты агрессии, разрушают ткани и клетки макроорганизма, обуславливая тем самым распространение патогенных микроорганизмов и их токсинов в инфицированных тканях. К таким ферментам относятся *плазмокоагулаза*, *нейраминидаза*, *коллагеназа*, *лецитиназа*, *гиалуронидаза* и некоторые другие ферменты. *Гиалуронидаза* стрептококков, например, расщепляет гиалуроновую кислоту в мембранах клеток соединительных тканей макроорганизма, что способствует распространению возбудителей и их токсинов в организме, обуславливая высокую инвазивность этих бактерий.

Плазмокоагулаза является главным фактором патогенности стафилококков, так как участвует в превращении протромбина в тромбин, который вызывает образование фибриногена, в результате чего каждая бактерия покрывается пленкой, предохраняющей ее от фагоцитоза. Ферменты микроорганизмов, такие как лигазы и рестриктазы, нашли широкое применение в биотехнологии, в том

числе в генетической инженерии, для получения различных биологически активных веществ, гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, а также ряда продуктов в легкой и пищевой промышленности.

Ферменты микроорганизмов характеризуют их биологические свойства и поэтому их исследуют с целью идентификации бактерий. В зависимости от субстрата гидролитические ферменты принято делить на две большие группы:

- *гидролитические* или *сахаролитические ферменты*, субстратом для которых являются различные сахара, а продуктами их расщепления - кислоты, спирты, альдегиды, H_2O и CO_2 ;

- *протеолитические ферменты*, расщепляющие белки с образованием полипептидов, аминокислот, аммиака, индола, сероводорода.

Для изучения активности ферментов при идентификации микроорганизмов широко используют дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят определенные субстраты - сахара или белки.

При исследовании *гидролитической* активности бактерий распространены моносубстратные дифференциально-диагностические среды Гисса (пестрый ряд Гисса), лактозосодержащие среды Эндо, Левина, Плоскирева, дисубстратные среды Ресселя, полисубстратные среды Клигlera и Олькеницкого. Последние могут служить и для изучения протеолитических свойств бактерий, так как рост микроорганизмов сопровождается высвобождением аммиака. *Протеолитические ферменты* бактерий определяются также по выделению индола, сероводорода, расщеплению некоторых аминокислот, например, фенилаланина, лизина, цистина. Протеолитические ферменты способны изменять (разжижать) желатину, причем, разные виды бактерий по разному изменяют «столбик» желатины в пробирке с посевом микроорганизма. Так, при росте холерного вибриона «столбик» желатины принимает форму гвоздя, при росте стафилококка - чулка, при росте синегнойной палочки наблюдается послойное разжижение среды.

Окислительно-восстановительные ферменты, дегидрогеназы, каталазу определяют по изменению органического красителя - акцептора водорода. Способность микроорганизмов

использовать в качестве источника углерода цитрат оценивают в специальных тестах основанных на работе ферментов.

В практических бактериологических лабораториях широко применяют микро - и экспресс-методы для ориентировочного изучения биохимических свойств микроорганизмов. Для этой цели существует множество тест-систем. Наиболее часто используют систему индикаторных бумаг (СИБ). СИБы представляют из себя диски фильтровальной бумаги, пропитанные растворами сахаров или других субстратов в сочетании с индикаторами. Такие диски опускают в пробирку с выросшей в жидкой питательной среде культурой. По изменению цвета диска с субстратом судят о работе фермента. Микро-тест системы для изучения идентификации энтеробактерий представлены одноразовыми пластиковыми контейнерами со средами, содержащими различные субстраты, с добавлением индикаторов. Посев чистой культуры микроорганизмов в такие тест-системы позволяет быстро выявить способность бактерий утилизировать цитраты, глюкозу, сахарозу, выделять аммиак, индол, разлагать мочевины, лизин, фенилаланин и т.д.

Процессы биосинтеза веществ микробной клетки протекают с затратой энергии. Большинство микробов используют энергию химических реакций с участием кислорода воздуха. Этот процесс окисления питательных веществ с выделением энергии называется *дыханием*.

Энергия высвобождается при окислении неорганических (аутотрофы) или органических (гетеротрофы) веществ.

Дыхание микробов – одна из основных форм катаболизма микробов (бактерий), представляет собой биологический процесс, сопровождаемый окислением или восстановлением разнообразных, в основном органических соединений с последующим выделением энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) – важнейшего переносчика энергии.

В результате этих химических реакций освобождается энергия, которая используется микробами для усвоения питательных веществ, синтеза белков их тела, движения, роста, размножения и других необходимых функций живого организма.

Степень аэробности или анаэробности среды может быть охарактеризована количественно при помощи **окислительно-восстановительного потенциала**.

Окислительно-восстановительный потенциал выражают символом gH_2 . Это индекс аналогичный pH.

pH выражает степень кислотности и щелочности, а gH_2 — степень аэробности и анаэробности. Это отрицательный логарифм концентрации атомов водорода в среде. В водном растворе, полностью насыщенном кислородом, $gH_2 = 41$, а в условиях полного насыщения среды водородом $gH_2 = 0$. Таким образом, шкала от 0 до 41 характеризует любую степень аэробности.

Облигатные аэробы, не способные существовать без свободного кислорода, не могут жить при низких значениях gH_2 . — ниже 10. Однако и величины gH_2 выше 30 для этих организмов не благоприятны. Облигатные аэробы защищаются от чрезмерного окисления выделением в среду сильных восстановителей.

Факультативно анаэробные микроорганизмы сохраняют метаболическую активность в широком диапазоне gH_2 — от 0 до 30.

Облигатные анаэробы жизнедеятельны при gH_2 не выше 18-20. Однако при этих показателях они уже не размножаются, а осуществляют обмен веществ, приводящий к выделению в среду восстановителей для снижения окислительно-восстановительного потенциала. Размножаться анаэробы могут лишь при значениях gH_2 не выше 3-5.

Все бактерии по типу дыхания подразделяются на облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы.

Облигатные (строгие) аэробы развиваются при наличии в атмосфере 20% кислорода (микобактерии туберкулеза), содержат ферменты, с помощью которых осуществляется перенос водорода от окисляемого субстрата к кислороду воздуха. Аэробные бактерии в процессе дыхания окисляют различные органические вещества (углеводы, белки, жиры, спирты, органические кислоты и пр.).

Микроаэрофилы нуждаются в значительно меньшем количестве кислорода, и его высокая концентрация хотя и не убивает бактерии, но задерживает их рост (актиномицеты, бруцеллы, лептоспиры).

Факультативные анаэробы могут размножаться как в присутствии, так и в отсутствие кислорода (большинство патогенных и сапрофитных микробов — возбудители сальмонеллез, кишечная палочка).

Облигатные анаэробы — бактерии, для которых наличие молекулярного кислорода является губительным (клостридии - возбудители столбняка, ботулизма).

Аэробное дыхание — конечным акцептором электронов (окислителем) выступает кислород.

Фазы аэробного дыхания

Процесс аэробного дыхания подразделяется на две фазы:

1. Реакции, при которых органический субстрат окисляется до CO_2 , а освобождающиеся атомы водорода перемещаются к акцептору.

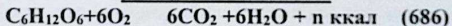
Эта фаза состоит из цикла реакций гликолиза, приводящих к образованию пирувата (пировиноградной кислоты) и цикла реакций Кребса (цикла трикарбоновых кислот — ЦТК).

2. Окисление освобождающихся атомов водорода кислородом с образованием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ).

Обе фазы приводят к окислению субстрата до углекислого газа (CO_2) и воды (H_2O), и образованию биологически полезной энергии в виде различных соединений: аденозинтрифосфата (АТФ); цитозинтрифосфата (ЦТФ); уридинтрифосфата (УТФ); гуанозинтрифосфата (ГТФ); креатинфосфата; ацетилфосфата.

Схема процесса дыхания аэробных бактерий:

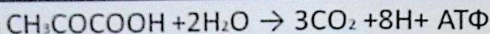
Окисление глюкозы:



Акцептор — кислород.

Если исходным субстратом выступает углевод, он ферментативно расщепляется до пировиноградной кислоты (гликолиз), та в свою очередь окисляется до ацетил-КоА, после чего в ЦТК водородные атомы и электроны передаются на пиридиновые дегидрогеназы, которые вступают в **дыхательную цепь**. В конечном счете, ионы водорода связываются с кислородом, а в процессе **окислительного фосфорилирования** образуется АТФ.

Суммарно цикл Кребса можно выразить следующим уравнением:



ЗНАДН

ФАДН₂

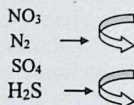
ЦТК — замкнутая система реакций, в которой происходит окончательное окисление (до CO_2 и H_2O) углерода органических молекул. Выделяется небольшое количество энергии (АТФ) и формируются промежуточные соединения (клетка их может использовать в качестве субстратов для биосинтеза).

Анаэробное дыхание — конечным акцептором электронов выступают неорганические вещества (сульфаты, нитраты). Начальные этапы дыхания у аэробов и анаэробов совпадают, но из-за отсутствия у последних некоторых ферментов дыхательной цепи (цитохромов) конечные этапы окисления у них заблокированы. В итоге субстраты при анаэробном дыхании расщепляются не полностью. Энергия запасается путем субстратного фосфорилирования. Энергетический выход при этом гораздо ниже, чем при окислительном фосфорилировании.

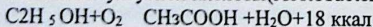
Роль конечного акцептора электронов может играть одно из окисленных неорганических соединений: нитрат, нитрит, сульфат, карбонат, фумарат (единственный случай — орг. в-во) и др., но не O_2 .

Анаэробное дыхание

- нитратное окисление
 - (Факультативные Анаэробы) Донор Водорода
 - сульфатное окисление
- (облигатные анаэробы) донор водорода



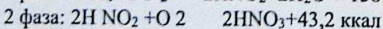
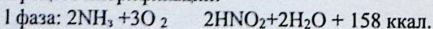
Окисление уксусной кислоты (Acetobacter aceti):



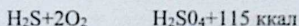
этил спирт

уксус. спирт

Процесс нитрификации:



Окисление сероводорода:



Вывод: у некоторых бактерий вместо CO_2 и H_2O образуются промежуточные компоненты, которые используются клеткой для образования структурных элементов.

При анаэробном дыхании бактерий происходит биохимические реакции окисления органических и неорганических субстратов, в ходе которых осуществляется перенос электронов от донора к акцептору (которым не может являться кислород), накапливается мембранный потенциал и синтезируется аденозинтрифосфат (АТФ).

Энергетически анаэробное дыхание значительно менее выгодно, нежели аэробное.

К анаэробному дыханию способны прокариоты (как бактерии, так и археи), а также некоторые эукариоты, утратившие митохондрии.

Микроорганизмы, использующие в качестве донора электронов органические субстраты, называются **органоотрофами**, а неорганические – **литотрофами**.

Процессы разложения органических веществ в бескислородных условиях, сопровождающиеся выделением энергии, называют **брожением**.

Дыхание у анаэробов, участвующих в брожении, происходит путем ферментации субстрата с образованием небольшого количества энергии.

В зависимости от участия определенных механизмов и субстратов различают следующие виды брожения: спиртовое, осуществляемое дрожжами, молочно-кислое, вызываемое молочно-кислыми бактериями, масляно-кислое и пр.

Брожение – конечным акцепторов электронов, равно как и донором, выступают **органические соединения**. Это тоже анаэробный процесс и субстраты также окисляются не полностью.

Особенность брожения – это превращение на последних этапах пирувата в различные конечные метаболиты (спирты и органические кислоты). В этих реакциях энергия не высвобождается, но они необходимы для регенерации НАД⁺.

Энергия также запасается путем субстратного фосфорилирования.

Дыхательный аппарат бактерий

Наибольшая плотность дыхательных ферментов у бактерий наблюдается в мезосомах – инвагинациях ЦПМ внутрь клетки.

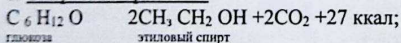
Среди ферментов выделяют:

- **пиридиновые дегидрогеназы** (первичные) – окисляют субстрат, отнимая водород;
- **флавиновые дегидрогеназы** (вторичные) – принимают водород от первичных дегидрогеназ, но для отдельных субстратов могут и сами работать как первичные;
- **цитохромы** – переносчики водорода от вторичных дегидрогеназ на кислород;
- **убихиноны** – свободные переносчики водорода по мембране (не ферменты).

Расщепление органических веществ без участия кислорода с образованием энергии называется брожением.

Акцепторами ионов водорода является не O_2 , а другие вещества, чаще органические вещества.

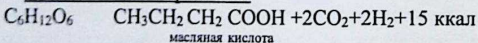
1. Спиртовое брожение



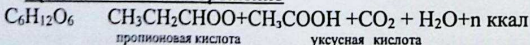
2. Молочнокислое брожение



3. Маслянокислое брожение



4. Пропионовокислое брожение



Анаэробные дегидрогеназы (Палладин, Виланд)



субстрат + дегидрогеназа - НАД ~ НАД + окисленный субстрат



Неоокисленная форма

/ Н / Н

субстрат + дегидрогеназа - НАДФ ~ НАДФ+ окисленный
субстрат

\ Н \ Н

Неоокисленная форма

Аэроб. дегидрогеназы

/ Н

1) субстрат + ФАД ---- ФАД-Н₂ (окисление) + субстрат
окисляется

\ Н -

2) ФАД - Н₂ + O₂ ---- ФАД (окисление) + H₂O₂

3) ФАД - Н₂ + 1/2 O₂ ---- ФАД (окисление) - Н₂O

Варбруг Ганс, Эйлер Хельпин Ханс ФОН – лауреаты
Нобелевской премии.

Контрольные вопросы:

1. Каковы потребности микроорганизмов в питательных веществах?

2. Как классифицируют микроорганизмы зависимости от источника

углерода и энергии?

3. Охарактеризуйте тип питания хемоорганогетеротрофов.

4. Какие типы питания Вы знаете?

5. Что такое «ауксотрофные микроорганизмы»?

6. Когда при поступлении вещества в клетку затрачивается энергия?

7. На какие группы распределяют микроорганизмы в зависимости от

природы окисляемого субстрата (источника электронов)?

8. Что такое ферменты?

9. Каковы составные части ферментов?

10. Классификация микробных ферментов: по химическому составу, по механизму действия, по локации.

11. Значение ферментов при дифференциации микроорганизмов.

12. Ядовитые ферменты микроорганизмов, которые страдают от болезни
13. Каков энергетический эффект процесса дыхания?
14. Какое количество молекул АТФ образуется при анаэробном окислении одной молекулы глюкозы?
15. Перечислить основные этапы анаэробного окисления глюкозы.
16. Перечислить основные этапы аэробного окисления глюкозы.
17. Привести суммарную реакцию процесса дыхания.
18. На какие группы делятся микроорганизмы в зависимости от отношения к кислороду?
19. Какие окислительно-восстановительные ферменты имеются в клетках облигатных анаэробов?
20. Привести примеры микроорганизмов, которые относятся к факультативным анаэробам.
21. Что понимается под «биологическим окислением»?
22. Что такое «брожение»?

7. 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 определенных размеров, клетка прекращает рост и начинает размножаться.

Ростом микроорганизмов называют генетически контролируемое увеличение биохимических компонентов клетки. Росту бактерий сопутствует увеличение *размера* и *биомассы* клеток. При этом следует разделять понятия "увеличение *клеточной массы*", или "*плотности бактерий*" (единицы массы на единицу объема среды), и "увеличение *количества клеток*" (концентрация бактерий в единице объема среды). Например, при концентрации клеток дрожжей 10^{10} /мл биомасса составляет около 1 г. При малых размерах клеток масса 10^{10} бактерий/мл будет значительно меньше. Увеличение биомассы или концентрации бактерий в единице объема среды характеризует процесс размножения *клеточной популяции*, произошедшей из одного клона. Помимо этого, существует термин "*развитие*"

микроорганизмов", означающий совершенствование во времени их структурной организации и функций. Для этого часто используют термин "плотность популяции"

Под *размножением* микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. Иначе можно сказать: размножение — это повышение числа особей микробной популяции.

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение), которое происходит в различных плоскостях, с образованием многообразных сочетаний клеток.

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. При удвоении 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 ДНК.

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 колеблется от 16 до 20 мин; у микобактерий туберкулеза деление наступает лишь через 18—20 ч; для клетки культуры тканей млекопитающих требуются сутки. Следовательно, бактерии большинства видов размножаются почти в 100 раз быстрее, чем клетки культуры тканей.

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:

- *разламывающее разделение*, когда две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают цитоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга, при этом образуются цепочки (сибиреязвенные бациллы);

- *скользящее разделение*, при котором после деления клетки обособляются и одна из них скользит по поверхности другой (отдельные формы эшерихий);

- *секущее разделение*, когда одна из разделившихся клеток свободным концом описывают дугу круга, центром которого является точка ее контакта с другой клеткой, образуя римскую пядерку или клинопись (коринебактерии дифтерии, листерии).

Под влиянием неблагоприятных внешних факторов (соли желчных кислот, УФ-лучи, ПАВ, антибиотики и т.д.) *размножение* клетки может остановиться с *сохранением ее роста*. В таком случае возможно образование удлинённых нитевидных клеток.

В соответствии с *ориентацией плоскостей* и особенностями деления образуются различные формы микроорганизмов: парные клетки (*Neisseria*, *Moraxella* и др.), цепочки (*Streptococcus* и др.), гроздья (*Staphylococcus* и др.), пакеты (*Sarcina* и др.).

Фазы развития бактериальной популяции. Теоретически допускается, 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 принято показывать 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 роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности:

1. *Исходная* (стационарная, латентная, или фаза покоя). Представляет собой время от момента посева бактерий на питательную среду до их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшаться. Продолжительность исходной фазы 1—2 ч.

2. *Фаза задержки размножения.* В течение этой фазы бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Период этой фазы занимает около 2 ч и зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспосабливаются быстрее, чем старые); биологических особенностей микробных клеток (для бактерии кишечной группы 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» (англ. lag — отставание, запаздывание).

3. *Логарифмическая фаза.* В этой фазе скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (лат. generatio — рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий станет удваиваться в геометрической прогрессии. Это означает, что в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй генерации обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из полученных четырех формируются восемь и т. д. Следовательно, после n генераций количество клеток в культуре будет равно $2n$. Длительность логарифмической фазы составляет 5—6 ч.

4. *Фаза отрицательного ускорения.* Скорость размножения бактерий перестает быть максимальной, число делящихся особей уменьшается, а число погибших увеличивается (длительность около 2 ч). Одна из возможных причин, замедляющих размножение бактерий, — истощение питательной среды, т. е. исчезновение из нее веществ, специфических для данного бактериального вида.

5. *Стационарная фаза максимума.* В ней число новых бактерий почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжается эта фаза 2 ч.

6. *Фаза ускорения гибели.* Характеризуется прогрессивным превосходством числа погибших клеток над количеством вновь нарождающихся. Длится она около 3 ч.

7. *Фаза логарифмической гибели.* Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью (длительность около 5 ч).

8. Фаза уменьшения скорости отмирания. Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

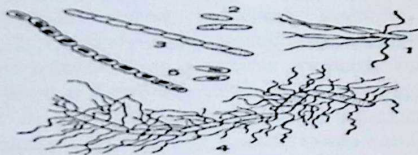


Рис. 15. Цикл развития сенной палочки: 1 - молодая сенная палочка; 2 - сенная палочка, сбросившая жгутики; 3 - деление цепочки клеток; 4 - образование жгутиков у цепочек; 5 - образование спор.
Займствовано из Интернет-ресурсов

8. Действие физических, химических, биологических факторов на микроорганизмы

Действие физических факторов на микроорганизмы

Физические факторы: температура, лучистая энергия, высушивание, ультразвук, давление, фильтрация, стерилизация, пастеризация.

Факторы окружающей среды могут оказывать на микроорганизмы *благоприятное воздействие* (стимуляция роста) и *отрицательное влияние*: *микробицидное действие* (уничтожающее) и *микростатическое действие* (подавление роста), а также *мутажное действие*.

Действие температуры на микроорганизмы.

Температура – важный фактор, влияющий на жизнедеятельность микроорганизмов. Для микроорганизмов различают минимальную, оптимальную и максимальную температуру. *Оптимальная* – температура, при которой происходит наиболее интенсивное размножение микробов. *Минимальная* – температура, ниже которой микроорганизмы не проявляют жизнедеятельности. *Максимальная* – температура, выше которой наступает гибель микроорганизмов.

По отношению к температуре различают 3 группы микроорганизмов:

1. *Психрофилы* (холодолобивые). Оптимум – 10 - 15°C, максимум – 25 -30°C, минимум – 0-5 С. Это обитатели почвы, морей, пресных водоемов (сапрофиты) и некоторые паразиты: паразиты холодолобивых животных, некоторые виды иерсиний, клебсиелл, псевдомонад, вызывающих заболевания у человека.

2. *Мезофилы*. Оптимум – 30-37°C. Минимум – 15-20°C. Максимум – 43-45°C. Обитают в организме теплокровных животных. К ним относятся большинство патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

3. *Термофилы*. Оптимум – 50-60°C. Минимум - 45°C. Максимум - 75°C. Обитают в горячих источниках, участвуют в процессах самонагревания навоза, зерна. Они не способны размножаться в организме теплокровных животных, поэтому не имеют медицинского значения.

Благоприятное действие оптимальной температуры используется при выращивании микроорганизмов с целью лабораторной диагностики, приготовления вакцин и других препаратов.

Тормозящее действие низких температур используется при хранении продуктов и культур микроорганизмов в условиях холодильника. Низкая температура приостанавливает гнилостные и бродильные процессы. Механизм действия низких температур – затормаживание в клетке процессов метаболизма и переход в состояние анабиоза.

Губительное действие высокой температуры (выше максимальной) используется при стерилизации. Механизм действия – денатурация белка (ферментов), повреждение рибосом, нарушение осмотического барьера. Наиболее чувствительны к действию высокой температуры психрофилы и мезофилы. Особую устойчивость проявляют споры бактерий.

Действие лучистой энергии и ультразвука на микроорганизмы.

Различают неионизирующее (ультрафиолетовые и инфракрасные лучи солнечного света) и ионизирующее излучение (g-лучи и электроны высоких энергий).

Ионизирующее излучение обладает мощным проникающим действием и повреждает клеточный геном. Механизм повреждающего действия: ионизация макромолекул, что

сопровождается развитием мутаций или гибелью клетки. При этом летальные дозы для микроорганизмов выше, чем для животных и растений.

Механизм повреждающего действия УФ-лучей: образование димеров тимина в молекуле ДНК, что прекращает деление клеток и служит основной причиной их гибели. Повреждающее действие УФ-лучей в большей мере выражено для микроорганизмов, чем для животных и растений.

Ультразвук (звуковые волны 20 тыс. гц) обладает бактерицидным действием. *Механизм: образование* в цитоплазме клетки *кавитационных полостей*, которые заполняются парами жидкости и в них возникает давление до 10 тыс. атм. Это приводит к образованию высокореактивных гидроксильных радикалов, к разрушению клеточных структур и деполимеризации органелл, денатурации молекул.

Ионизирующее излучение, УФ-лучи и ультразвук используются для стерилизации.

Действие высушивания на микроорганизмы.

Вода необходима для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов. Снижение влажности среды приводит к переходу клеток в состояние покоя, а затем и к гибели. *Механизм губительного действия высушивания: обезвоживание цитоплазмы и денатурация белков.*

Более чувствительны к высушиванию патогенные микроорганизмы: возбудители гонореи, менингита, брюшного тифа, дизентерии, сифилиса и др. Более устойчивы споры бактерий, цисты простейших, бактерии, защищенные слизью мокроты (туберкулезные палочки).

В практике высушивание используется для консервирования мяса, рыбы, овощей, фруктов, при заготовке лекарственных трав.

Высушивание из замороженного состояния под вакуумом — *лиофилизация* или *лиофильная сушка*. Ее используют для сохранения культур микроорганизмов, которые в таком состоянии годами (10-20 лет) не теряют жизнеспособности и не меняют свойств. Микроорганизмы находятся при этом в состоянии анабиоза. Лиофилизация используется в производстве биопрепаратов из живых микроорганизмов: зубиотиков, фагов, живых вакцин против туберкулеза, чумы, туляремии, бруцеллеза, гриппа и др.

Стерилизация – это процесс полного уничтожения в объекте всех жизнеспособных форм микробов, в том числе спор.

Различают 3 группы методов стерилизации: физические, химические и физико-химические. Физические методы – стерилизация высокой температурой, ионизирующим облучением, ультразвуком, фильтрация через стерильные фильтры. Химические методы – использование химических веществ, а также газовая стерилизация. Физико-химические методы – совместное использование физических и химических методов. Например, высокая температура и антисептики.

Стерилизация высокой температурой.

К этому методу относятся: 1) стерилизация сухим жаром; 2) стерилизация паром под давлением; 3) стерилизация текучим паром; 4) тиндализация и пастеризация; 5) прокалывание; 6) кипячение.

Стерилизация сухим жаром.

Метод основан на бактерицидном действии нагретого до 165-170°C воздуха в течение 45 мин.

Аппаратура: сухожаровой шкаф (печь Пастера). Печь Пастера – металлический шкаф с двойными стенками, обшитый снаружи материалом, плохо проводящим тепло (асбест). Нагретый воздух циркулирует в пространстве между стенками и выходит наружу через специальные отверстия. При работе необходимо строго следить за нужной температурой и временем стерилизации. Если температура будет более высокой, то произойдет обугливание ватных пробок, бумаги, в которую завернута посуда, а при более низкой температуре требуется более длительная стерилизация. По окончании стерилизации шкаф открывают только после его остывания, иначе стеклянная посуда может потрескаться из-за резкой смены температуры.

Материал и режим стерилизации:

а) стеклянные, металлические, фарфоровые предметы, посуда, завернутые в бумагу и закрытые ватно-марлевыми пробками для сохранения стерильности (165-170°C, 45 мин);

б) термостойкие порошкообразные лекарственные средства – тальк, белая глина, окись цинка (180-200°C, 30-60 мин);

в) минеральные и растительные масла, жиры, ланолин, вазелин, воск (180-200°C, 20-40 мин).

Стерилизация паром под давлением.

Наиболее эффективный и широко применяемый в микробиологической и клинической практике метод.

Метод основан на гидролизующем действии пара под давлением на белки микробной клетки. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает высокую эффективность этой стерилизации, при которой погибают самые стойкие споровые бактерии.

Аппаратура – автоклав. Автоклав состоит из 2-х металлических цилиндров, вставленных друг в друга с герметически закрывающейся крышкой, закручивающейся винтами. Наружный котел – водопаровая камера, внутренний – стерилизационная камера. Имеется манометр, паровыпускной кран, предохранительный клапан, водомерное стекло. В верхней части стерилизационной камеры – отверстие, через которое пар проходит из водопаровой камеры. Манометр служит для определения давления в стерилизационной камере. Между давлением и температурой существует определенная зависимость: 0,5 атм - 112°C, 1-01,1 атм – 119-121°C, 2 атм - 134°C. Предохранительный клапан – для защиты от чрезмерного давления. При повышении давления выше заданного, клапан открывается и выпускает лишний пар.

Порядок работы. В автоклав наливают воду, уровень которой контролируют по водомерному стеклу. В стерилизационную камеру помещают материал и плотно закручивают крышку. Паровыпускной кран открыт. Включают нагрев. После закипания воды кран закрывают лишь тогда, когда будет вытеснен весь воздух (пар идет непрерывной сильной сухой струей). Если кран закрыть раньше, показания манометра не будут соответствовать нужной температуре. После закрытия крана, в котле постепенно повышается давление. Начало стерилизации – тот момент, когда стрелка манометра показывает заданное давление. По истечении срока стерилизации прекращают нагрев и охлаждают автоклав до возвращения стрелки манометра к 0. Если выпустить пар раньше, жидкость может вскипеть из-за быстрой смены давления и вытолкнуть пробки (стерильность нарушается). Когда стрелка манометра вернется к 0, осторожно открывают паровыпускной кран, спускают пар и затем вынимают стерилизуемые объекты. Если не выпустить пар после возвращения стрелки к 0, вода может

конденсироваться и смочить пробки и стерилизуемый материал (стерильность нарушится).

Материал и режим стерилизации:

а) стеклянная, металлическая, фарфоровая посуда, белье, резиновые и корковые пробки, изделия из резины, целлюлозы, древесины, перевязочный материал (вата, марля) (119 - 121°C, 20-40 мин));

б) физиологический раствор, растворы для инъекций, глазные капли, дистиллированная вода, простые питательные среды - МПБ, МПА (119-121°C, 20-40 мин);

в) минеральные, растительные масла в герметически закрытых сосудах (119-121°C, 120 мин);

Стерилизация текучим паром.

Метод основан на бактерицидном действии пара (100°C) в отношении только вегетативных клеток.

Аппаратура – автоклав с незавинченной крышкой или аппарат Коха.

Аппарат Коха - это металлический цилиндр с двойным дном, пространство в котором на 2/3 заполнено водой. В крышке – отверстия для термометра и для выхода пара. Наружная стенка облицована материалом, плохо проводящим тепло (линолеум, асбест). Начало стерилизации – время от закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру.

Материал и режим стерилизации. Этим методом стерилизуют материал, который не выдерживает температуру выше 100°C: питательные среды с витаминами, углеводами (среды Гисса, Эндо, Плоскирева, Левина), желатином, молоко.

При 100°C споры не погибают, поэтому стерилизацию проводят несколько раз - *дробная стерилизация* -20-30 мин ежедневно в течение 3-х дней.

В промежутках между стерилизациями материал выдерживают при комнатной температуре для того, чтобы проросли споры в вегетативные формы. Они будут погибать при последующем нагревании при 100°C.

Тиндализация и пастеризация.

Тиндализация - метод дробной стерилизации при температуре ниже 100°C. Она используется для стерилизации объектов, которые не выдерживают 100°C: сыворо́тка, асцитическая

жидкость, витамины. Тиндализация проводится в водяной бане при 56°C по 1 часу 5-6 дней.

Пастеризация – частичная стерилизация (споры не погибают), которая проводится при относительно низкой температуре однократно. Пастеризацию проводят при 70-80°C, 5-10 мин или при 50-60°C, 15-30 мин. Пастеризация используется для объектов, теряющих свои качества при высокой температуре. Пастеризацию, например, используют для некоторых пищевых продуктов: молока, вина, пива. При этом не повреждается их товарная ценность, но споры остаются жизнеспособными, поэтому эти продукты нужно хранить на холоде.

Влияние ультрафиолетового и инфракрасного излучений в бактерию

Длина лучи (нм)	УФ		Видные светы				ИК			
	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100
Повреждение ДНК белками	+	+								
ДНК блокирует активность	-	+	+	+						
Фототаксис и явления фотосинтеза в эукариотических клетках		+	+	+	+	+				
Фототаксис и явления фотосинтеза в прокариотических клетках		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Увеличение прокариот при разных температурах и их классификация соответственно

Температура(°C)	- 20	- 10	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Облигатные психрофилы			+	+	+								
Факультативные психрофилы					+	+							
Мезофилы						+	+						
Термотолерантные термофилы							+	+					
Факультативные								+	+				

Химические вещества, используемые для дезинфекции, относятся к различным группам, среди которых наиболее широко представлены вещества, относящиеся к хлор-, йод- и бромсодержащим соединениям и окислителям.

Антимикробным действием обладают также кислоты и их соли (оксолиновая, салициловая, борная); щелочи (аммиак и его соли).

Стерилизация – предполагает полную инактивацию микробов в объектах, подвергшихся обработке.

Дезинфекция — процедура, предусматривающая обработку загрязненного микробами предмета с целью их уничтожения до такой степени, чтобы они не смогли вызвать инфекцию при использовании данного предмета. Как правило, при дезинфекции погибает большая часть микробов (в том числе все патогенные), однако споры и некоторые резистентные вирусы могут остаться в жизнеспособном состоянии.

Асептика – комплекс мер, направленных на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Методы асептики применяют для борьбы с экзогенной инфекцией, источниками которой являются больные и бактерионосители.

Антисептика – совокупность мер, направленных на уничтожение микробов в ране, патологическом очаге или организме в целом, на предупреждение или ликвидацию воспалительного процесса.

Действие биологических факторов. Антибиотики

Биологические факторы – это различные формы влияния микробов друг на друга, а также действие на микроорганизмы факторов иммунитета (лизоцим, антитела, ингибиторы, фагоцитоз) во время их пребывания в макроорганизме. Совместное существование различных организмов – *симбиоз*. Выделяют следующие формы симбиоза.

Мутуализм – такая форма сожительства, когда оба партнера получают взаимную выгоду (например, клубеньковые бактерии и бобовые растения).

Антагонизм – форма взаимоотношений, когда один организм наносит вред (вплоть до гибели) другому организму своими продуктами метаболизма (кислоты, антибиотики, бактериоцины),

благодаря лучшей приспособленности к условиям среды, путем непосредственного уничтожения (например, нормальная микрофлора кишечника и возбудители кишечных инфекций).

Метабиоз — форма сожительства, когда один организм продолжает процесс, вызванный другим (использует его продукты жизнедеятельности), и освобождает среду от этих продуктов. Поэтому создаются условия для дальнейшего развития (нитрифицирующие и аммонифицирующие бактерии).

Сителлизм — один из сожителей стимулирует рост другого (например, дрожжи и сарцины вырабатывают вещества, способствующие росту других, более требовательных к питательным средам, бактерий).

Комменсализм — один организм живет за счет другого (извлекает выгоду), не причиняя ему вреда (например, кишечная палочка и организм человека).

Хищничество — антагонистические взаимоотношения между организмами, когда один захватывает, поглощает и переваривает другой (например, кишечная амеба питается кишечными бактериями).

Паразитизм — форма антагонистических отношений, когда один организм использует другой для обеспечения своей жизнедеятельности как источник питания и среду для обитания с причинением ему вреда (например, бактериофаги — паразиты бактерий).

Конкурентоспособность в антагонистических взаимоотношениях у некоторых микроорганизмов находится в тесной зависимости от их способности продуцировать и выделять в среду обитания особые вещества, сильно угнетающие другие виды — *антибиотики* («анти» — против, «биос» — жизнь). Этих веществ известно довольно много. Те из них, которые оказались практически безвредными для человека, но очень бактерицидными (убивающими бактерий), широко применяются в медицине, в животноводстве, как лечебные и стимулирующие средства. Некоторые из них обладают не бактерицидным, а бактериостатическим действием (останавливают развитие бактерий). Характерным свойством антибиотиков является их избирательность, заключающаяся в том, что каждый из них действует только на определенную группу микроорганизмов. Имеются и такие, спектр действий которых достаточно широк.

У многих микроорганизмов при длительном многократном воздействии на них небольших доз антибиотиков вырабатывается устойчивость к препаратам. *Антибиотики* — вещества малостойкие, активность их снижается под действием нагреваний, Кислот, света и других факторов.

Пенициллин— антибактерийное вещество, выделяемое плесневыми грибами из группы пеницилловых. Наиболее чувствительны к пенициллину стрептококки, стафилококки и пневмококки. Палочковидные формы более устойчивы. Устойчивость к пенициллину некоторых бактерий объясняется тем, что они продуцируют фермент пенициллиназу, разрушающий этот антибиотик.

Стрептомицин вырабатывается актиномицетами. Обладает свойством подавлять рост многих микроорганизмов. Применяется при лечении острой формы бруцеллеза, кишечных заболеваний и др.

Грамицидин вырабатывается почвенной бациллой бревис. Действует на стафилококков, стрептококков, пневмококков, возбудителей газовой гангрены, дизентерии, брюшного тифа, а также на сибиреязвенную бациллу.

Биомицин продуцируется актиномицетами. Подавляет рост многих бактерий.

К числу антибиотиков, вырабатываемых микроорганизмами, относятся также *тетрациклин* (группа близких по свойствам веществ) и другие соединения.

Антибиотические вещества используются в основном в лечебных целях. Широкого применения для подавления микробиологических процессов в пищевых продуктах они не получили, так как спектр действия каждого из них сравнительно узок, а микрофлора, обсеменяющая пищевые товары, очень разнообразна. Кроме того, широкое применение их в практике хранения очень быстро могло бы привести к потере ими лекарственного значения в связи с неизбежным появлением устойчивых к ним разновидностей микробов.

Лабораторные исследования ряда антибиотических веществ тем не менее показали, что в будущем, с расширением числа изученных антибиотиков, некоторые могут быть применены для обработки пищевых товаров. В промышленных масштабах уже применялась обработка биомицином рыбы южных районов

рыболовства. Установлена пригодность пенициллина, низина, хлортетрациклина для борьбы с микробами — вредителями дрожжевого производства.

Вещества, близкие по характеру действия к антибиотикам, способны продуцироваться и высшими организмами — животными и растительными. Такие вещества, открытые в 1928 г. советским исследователем Б. П. Токиным, были названы *фитонцидами*.

Фитонциды выделяют растения, они обладают губительным действием на бактерии, грибы. Особенно большой бактерицидностью обладают фитонциды лука, чеснока, алоэ, крапивы, листьев черемухи, можжевельника. Фитонциды, полученные из лука в виде кристаллического порошка в разведении 1:40 000, моментально убивают дифтерийные бактерии. На действии фитонцидов основано лечение ран травами. Фитонциды являются веществами летучими и оказывают влияние на микрофлору на расстоянии.

Фитонциды характеризуются менее выраженной специфичностью действия по сравнению с антибиотиками микробного происхождения. По химическим свойствам они представляют собой вещества, относящиеся к различным группам.

Удалось точно установить химическую природу некоторых фитонцидов. Из чеснока, например, выделен аллицин — маслянистая жидкость, растворимая в спирте. Он не обладает запахом чеснока, который появляется лишь при расщеплении аллицина соответствующим ферментом. Из лишайника «испанский мох» выделена и идентифицирована усниновая кислота, угнетающая рост туберкулезных бактерий.

Фитонциды удлиняют срок хранения пищевых продуктов.

Из веществ *животного происхождения*, обладающих свойствами антибиотиков, известны *лизозим* и *эритроцит*.

Лизозим — белок со щелочными свойствами, обнаружен во многих веществах и продуктах животного происхождения — в молоке, белке куриного яйца. Находится он также в слюне, слезах, сыворотке крови, рыбьей икре, лейкоцитах. Лизозим губителен для многих бактерий. Вызывает одновременно и растворение микробных клеток. Опыты по обработке икры осетровых рыб лизозимом для повышения ее устойчивости к микробной порче дали положительные результаты.

Эритроин получен из красных кровяных шариков крови животных. Обладает бактериостатическими свойствами по отношению к возбудителю дифтерии стафилококкам, стрептококкам.

Контрольные вопросы:

1. Какое явление называется хемотаксис?
2. Что такое положительный и отрицательный хемотаксис?
3. Бактерицидное и бактериолитическое действие химических веществ.
4. Какие микроскопические грибы и бактерии растут на pH?
5. Что такое дезинфекция?
6. Как химические вещества, используемые для дезинфекции, влияют на микробную клетку?
7. Какие факторы относятся к биологическим факторам?
8. Понятие об антибиотике?

Бактериофаги

Бактериофаги (ныне просто фаги) - вирусы бактерий.

Бактериофагия - процесс взаимодействия фагов с бактериями, заканчивающийся очень часто их разрушением (от лат. *bacteriophaga* - пожирающий бактерии).

Явление бактериофагии наблюдали многие ученые, но приоритет открытия фагов (1916 г.) принадлежит Ф. Д'Эреллю - канадскому ученому, работавшему в Париже в Институте Пастера.

Бактериофаги распространены повсеместно. Они встречаются всюду, где есть бактерии - в почве, воде, кишечном тракте человека и животных, гнойных выделениях и т. п. Особенно много фагов в сточных водах; из этого источника можно выделить практически любой фаг. Поскольку естественной средой обитания любого фага является микробная клетка, жизнь фагов связана с бактериями. Фагам присущи все биологические особенности, которые свойственны вирусам. Их геном представлен либо ДНК, либо РНК и заключен в белковую оболочку (капсид), структурные субъединицы которой уложены по типу либо спиральной, либо кубической симметрии. Крупные фаги, имеющие хвостик, устроены по типу бинарной симметрии (головка - икосаэдр, хвостик - спиральная симметрия). Фаги различаются по форме - нитевидные, сферические; фаги, имеющие головку и хвостик; по размерам - мелкие, среднего размера и крупные. Чем крупнее фаги,

тем больше у них генов и сложнее их жизненный цикл. К самым маленьким относится нитевидный фаг М13 геном которого (однонитевая кольцевидная молекула ДНК с м.м. 2МД) содержит 8 генов.

Наиболее сложно устроены крупные фаги, состоящие из головки и хвостика. У энтеробактерий обнаружено более 500 фагов, из них более 140 состоят из головки и хвостика. Например Фаг Т2, который паразитирует у *E. coli* и имеет следующую структуру: головка - икосаэдр, геном представлен двунитевой линейной ДНК, несущей около 200 генов.



Рис. 16.-Структура сложного бактериофага. Фаговые бляшки (зоны лизиса на культуре *E. coli*). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Головка с помощью воротника и зонтика связана с хвостиком, который имеет сложное строение - полый внутри стержень, заканчивающийся шестиугольной пластинкой с шестью шипами. В пластинке и шипах содержится лизоцим. Кроме того, хвостик имеет 6 ворсинок. У неактивного фага они свернуты и прикреплены к белкам чехла. В момент адсорбции ворсинки раскрываются и обеспечивают плотное прикрепление фага к бактериальной клетке. Основное назначение хвостика - обеспечение адсорбции фага на клетке. Длина хвостика сильно варьирует, благодаря своему сокращению, обеспечивает проникновение стержня через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану.

Резистентность фагов. По степени устойчивости к действию различных факторов внешней среды и химических веществ фаги

занимают место между вирусами и неспоровыми бактериями. Они устойчивы в пределах pH от 5,0 до 8,0, большинство из них не инактивируется холодными водными растворами глицерина и этилового спирта. На них не действуют такие ферментные яды, как цианид, фторид, динитрофенол, а также хлороформ и фенол. Фаги хорошо сохраняются в запаянных ампулах и в лиофилизированном состоянии, но они легко разрушаются при кипячении, действии кислот, химических дезинфектантов, при УФ-облучении.

Жизненный цикл фага

Различают фаги инфекционные, т. е. способные вызвать разные формы фаговой инфекции, и неинфекционные (вегетативные), или незрелые фаги, находящиеся еще в стадии размножения. В свою очередь инфекционные фаги разделяют на *покоящиеся* (находящиеся вне клетки), *вирулентные* (способные вызвать продуктивную форму инфекции) и *умеренные* фаги (способные вызывать не только продуктивную, но и редутивную фаговую инфекцию).

Жизненный цикл фага может проявляться в форме *продуктивной* (фаг размножается в клетке и выходит из нее), *редуктивной* (геном фага проникает в клетку, однако размножения фага не происходит, его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина, становится ее составной частью, т. е. фаг превращается в профаг, а клетка становится лизогенной) и *абортивной* инфекции, при которой взаимодействие фага с клеткой обрывается на какой-то стадии жизненного цикла фага, и он погибает.

Клетка, несущая профаг, называется лизогенной, потому что профаг, передающийся клеткой по наследству, может выйти из хромосомы, активироваться и вызвать продуктивную форму инфекции.

Если в результате *лизогении, т. е. внедрения профага в хромосому клетки-хозяина*, она получает новые наследуемые признаки, такую форму ее изменчивости называют *лизогенной конверсией*, т. е. изменчивостью, обусловленной лизогенией. Лизогенную конверсию вызывают только умеренные фаги.

Жизненный цикл фага, сопровождающийся продуктивной инфекцией, складывается из 6 последовательных стадий, каждая из которых, в свою очередь, состоит из нескольких этапов.

Адсорбция фагов на клеточной поверхности бактерий при помощи специфических рецепторов (белков-лоцманов), которые

располагаются на кончике нити, шипа или хвостика. В свою очередь, на клеточной стенке бактерии располагаются ее фагоспецифические рецепторы, распознаваемые фагом. Адсорбция фага - пусковой момент его жизненного цикла. Она очень специфична и поэтому обуславливает возможность практического использования фагов, например для идентификации бактерий, а также для лечебных и профилактических целей.

Проникновение фагового генома через клеточную стенку и цито-плазматическую мембрану внутрь клетки и освобождение его от оболочки (раздевание фага).

Установление фагового генома с помощью белка-лоцмана для реализации содержащейся в геноме информации:

а) однострунчатая ДНК - к репликативному аппарату для синтеза комплементарной ей нити и образования репликативной формы; далее ее поведение аналогично двуструнчатой ДНК;

б) двуструнчатая ДНК - к транскрипционному аппарату для синтеза мРНК и последующей трансляции вирусспецифических белков (ферментов и структурных);

в) РНК-геном - к трансляционному аппарату для синтеза вирусспецифических белков (ферментов репликации и структурных).

Репликация фаговой геномной ДНК или РНК. Сборка вновь синтезированных вирионов - заключение геномной НК в белковую оболочку, морфогенез фагов.

Выход вновь синтезированных фагов из клетки:

а) путем отпочковывания (M13 - единственный фаг, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели);

б) путем лизиса клетки изнутри. Он осуществляется свободным лизоцимом и вызывает гибель клетки.

Практическое применение фагов

Благодаря своему разрушающему (литическому) действию на бактерии фаги могут быть использованы с лечебно-профилактической целью при различных заболеваниях (дизентерия, холера, различные гнойно-воспалительные заболевания и т. д.). Наборы стандартных фагов, в том числе международные, используются для фаготипирования возбудителей ряда болезней (холеры, брюшного тифа, сальмонеллез, дифтерии, стафилококковых и других заболеваний). Фаги широко используют для изучения генетики микроорганизмов.

Применение фагов.

В медицине

Одной из областей использования бактериофагов является антибактериальная терапия, альтернативная приёму антибиотиков. Например, применяются бактериофаги: стрептококковый, стафилококковый, клебсиеллёзный, дизентерийный поливалентный, пиобактериофаг, коли, протейный и колипротейный и другие.

В настоящее время их применяют для лечения бактериальных инфекций, которые не чувствительны к традиционному лечению. Обычно, применение бактериофагов сопровождается большим, чем антибиотики, успехом там, где присутствуют биологические мембраны, покрытые полисахаридами, через которые антибиотики обычно не проникают. В настоящее время терапевтическое применение бактериофагов не получило одобрения на Западе, хотя и применяются фаги для уничтожения бактерий, вызывающих пищевые отравления, таких, как листерии. В многолетнем опыте в объёме крупного города и сельской местности доказана необычайно высокая лечебная и профилактическая эффективность дизентерийного бактериофага.

В биологии

Бактериофаги применяются в генной инженерии в качестве векторов, переносящих участки ДНК, возможна также естественная передача генов между бактериями посредством некоторых фагов (трансдукция).

Фаговые векторы обычно создают на базе умеренного бактериофага λ , содержащего двухцепочечную линейную молекулу ДНК. Левое и правое плечи фага имеют все гены, необходимые для литического цикла (репликации, размножения). Средняя часть генома бактериофага λ (содержит гены, контролирующие лизогению, то есть его интеграцию в ДНК бактериальной клетки) не существенна для его размножения и составляет примерно 25 тысяч пар нуклеотидов. Данная часть может быть заменена на чужеродный фрагмент ДНК. Такие модифицированные фаги проходят литический цикл, но лизогения не происходит. Векторы на основе бактериофага λ используют для клонирования фрагментов ДНК эукариот (то есть более крупных генов) размером до 23 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Причём, фаги без вставок —

менее 38 т. п. н. или, напротив, со слишком большими вставками — более 52 т. п. н. не развиваются и не поражают бактерии.

Бактериофаги M13, фаг T4, T7 и фаг λ используют для изучения белок-белковых, белок-пептидных и ДНК-белковых взаимодействий методом фагового дисплея.

Поскольку размножение бактериофага возможно только в живых клетках, бактериофаги могут быть использованы для определения жизнеспособности бактерий. Данное направление имеет большие перспективы, поскольку, одним из основных вопросов при разных биотехнологических процессах является определение жизнеспособности используемых культур. С помощью метода электрооптического анализа клеточных суспензий была показана возможность изучения этапов взаимодействия фаг-микробная клетка.

Контрольные вопросы:

1. Что такое бактериофаги? Феномен бактериофага.
2. Основные свойства бактериофагов.
3. Механизмы действия бактериофагов на бактериальные клетки.
4. Методы титрования и распределения фагов.
5. Использование бактериофагов для лечения заболеваний, лечения, профилактики заболеваний и других микробных сред

9. Распространение микроорганизмов в природе (почве, воздухе и воде)

Микроорганизмы широко распространены в окружающей среде. Их обнаруживают в почве, воде, воздухе, растениях, в пищевых продуктах, в организме человека и животных. Они встречаются в виде *биоценозов* – совокупности живых существ, населяющих одну и ту же среду обитания. Сложные взаимоотношения микроорганизмов со средой обитания, которые определяют их размножение, развитие и выживание, изучает специальная наука – *экология*.

Почва – благоприятная среда для обитания и размножения различных микроорганизмов. В состав микробных биоценозов почвы входят бактерии, грибы, простейшие и бактериофаги. Микроорганизмы почвы участвуют в круговороте веществ в природе, минерализации органических отходов, самоочищении почвы. Существенную роль в формировании микробного биоценоза почвы играют высшие растения, насекомые и животные.

Содержание микроорганизмов в почве зависит от ее химического

состава, влажности, температуры, pH и других показателей.

Почва населена различными микроорганизмами. Среди них азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*, клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии, грибы, серо- и железобактерии, актиномицеты, гнилостные бактерии и др. В плодородной почве обнаружены энтеробактерии, псевдомонады, бациллы и клостридии. Эти микроорганизмы изменяют pH почвы в кислую сторону, и в ней начинают развиваться молочнокислые бактерии, дрожжи, грибы и др. микроорганизмы.

Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы не входят в состав микробных биоценозов почвы и через определенное время погибают, чему способствуют неблагоприятные условия обитания, отсутствие необходимых питательных веществ, а также антагонизм почвенных бактерий.

Тем не менее, возбудители многих инфекционных болезней могут длительное время сохранять свою жизнеспособность в почве, поэтому почва является источником инфицирования пищевых продуктов патогенной микрофлорой. Так, установлена прямая зависимость между уровнем заболеваемости человека и животных кишечными инфекциями и неудовлетворительным состоянием почвы.

При проведении текущего санитарного надзора за состоянием почвы осуществляют краткий санитарно-микробиологический анализ, который заключается в определении общей бактериальной обсемененности и титра кишечной палочки. Общая бактериальная обсемененность характеризует загрязнение почвы органическими веществами, а присутствие в ней бактерий группы кишечной палочки свидетельствует об уровне фекального загрязнения почвы. Титр кишечной палочки загрязненных участков почвы составляет от 0,001 до 0,00001 г, а чистых – 1 г и более.

При полном санитарно-микробиологическом анализе, кроме вышеуказанных показателей, в почве определяют количество анаэробов, палочку протей и термофильные микроорганизмы. Так, по соотношению вегетативных и споровых форм анаэробной палочки перфрингенс можно судить о времени фекального загрязнения, наличие палочки протей указывает на загрязнение почвы органическими веществами животного происхождения, а наличие термофилов – на загрязнение почвы навозом или

компостами.

Воздух - является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов, что обусловлено недостатком питательных веществ и влаги, а также бактерицидным действием солнечных лучей. Поэтому количественный и видовой состав микрофлоры воздуха зависит от ряда факторов: климатических, метеорологических, сезонных, общего санитарного состояния местности и др. Наиболее часто в воздухе встречаются споры аэробных палочек рода *Bacillus*, пигментированные (окрашенные) штаммы бактерий (родов *Sarcina*, *Staphylococcus* и др.), а также грибы (родов *Penicillium*, *Aspergillus* и др.), дрожжи *Rhodotorula*.

Патогенные микроорганизмы попадают в воздух из почвы и выделений человека и животных (при кашле, чихании). Выживаемость патогенных микроорганизмов в воздухе зависит от биологических свойств возбудителя, а также влажности и температуры.

Санитарно-гигиеническое состояние воздуха оценивают по двум микробиологическим показателям: общей бактериальной обсемененности и содержанию гемолитических стрептококков и стафилококков (санитарно-показательные микроорганизмы воздуха). В 1 м³ воздуха производственных помещений не допускается содержания более 500 КОЕ/см³ в зимнее время года и 1500 КОЕ/см³ летом. По содержанию гемолитических стрептококков и стафилококков судят о присутствии в воздухе болезнетворных микробов. В 1 м³ воздуха не должно содержаться более 16 гемолитических стрептококков и стафилококков.

Для снижения бактериальной обсемененности воздуха в помещений проводят дезинфекцию воздуха физическими и химическими методами для уничтожения микроорганизмов — обработку ультрафиолетовыми лучами, а также обработку хлорсодержащими препаратами в виде их испарений и аэрозолей. Эффективным способом является озонирование воздуха.

Вода - является наиболее благоприятной средой для развития микроорганизмов.

В состав микрофлоры воды входят сапрофиты: флуоресцирующие бактерии, микрококки, реже встречаются бактерии рода *Bacillus*. Содержание в воде микроорганизмов зависит от содержания в ней органических веществ. Степень обсеменения воды организмами характеризуется понятием

сапробиность воды – это совокупность живых существ, обитающих в водах, загрязненных органическими веществами животного или растительного происхождения.

Количество микроорганизмов в 1 см³ воды может варьироваться в широких пределах – от единиц до миллионов. Вода открытых водоемов более богата сапрофитными микроорганизмами, чем воды подземных источников. В речной воде встречаются гниlostные, нитрифицирующие, азотфиксирующие, серо- и железобактерии и др.

Вода не является благоприятной средой для размножения болезнетворных микроорганизмов, тем не менее, многие из них сохраняются и выживают.

О безопасности воды в эпидемиологическом отношении судят по результатам ее санитарно-бактериологического исследования. Микробиологические показатели питьевой водопроводной воды нормированы ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством». Общая бактериальная обсемененность (микробное число) не более 100 клеток в 1 г, коли-титр – не менее 300 мл, коли-индекс – не более 3.

Коли-титр – наименьший объем воды, в котором содержится одна кишечная палочка.

Коли-индекс – количество кишечных палочек в 1 дм³ воды.

В СанПиНе 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», введенного в действие с 1 января 2002 г, предъявляются более жесткие требования к питьевой воде. Для оценки санитарного состояния воды в ней определяют общее микробное число – не более 50 КОЕ/см³; термотолерантные колиформные бактерии – не допускаются в 100 см³; общие колиформные бактерии также должны отсутствовать в 100 см³; споры сульфитредуцирующих клостридий – не допускаются в 20 см³; колифаги – в 100 см³.

Общее микробное число воды (ОМЧ) – количество мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на агаре при 37 °С в течение 24 часов.

К общим колиформным бактериям относятся граммотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с

образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые, кроме этого способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °C в течение 24 часов.

Сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре в течение 24 часов при температуре 44 °C.

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса через 18±2 часа при температуре 37 °C на ее газоне на питательном агаре. *Колифаги* – индикаторы очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

В отдельных случаях при санитарной оценке воды в качестве санитарно – показательного микроорганизма наряду с БГКП используют энтерококки. Так, в Международном Европейском стандарте на питьевую воду наличие энтерококка определяют в качестве дополнительного показателя фекального загрязнения воды.

Очистка и дезинфекция питьевой воды состоит из нескольких этапов:

1. *Отстаивание в специальных отстойниках.* При этом удаляются взвеси, нежелательные привкусы и запахи, происходит обесцвечивание, обессоливание и опреснение воды. Для ускорения отстаивания применяют коагулянты.

2. *Фильтрация через слой речного песка.* В верхних слоях фильтра формируется биологическая пленка, состоящая из содержащихся в воде примесей и хлопьев коагулянтов, на которых оседает большое количество микроорганизмов.

3. *Обеззараживание профильтрованной воды*, т.е. удаление оставшихся в воде микроорганизмов, среди которых могут быть и патогенные, с помощью различных дезинфицирующих средств (с помощью окислителей, путем озонирования, облучения ультрафиолетом, обработки ультразвуком).

Очистка сточных вод. Биологические методы очистки делятся на аэробные и анаэробные.

В свою очередь, *аэробная очистка* может протекать в естественных и в искусственно создаваемых условиях.

Очистка в естественных условиях проводится путем фильтрования сточных вод через слой почвы на полях орошения или полях фильтрации (почвенные методы очистки), а также в очистных прудах.

При *аэробной очистке в искусственных условиях* процесс очищения ведут в специальных сооружениях: в биофильтрах и аэротенках. В аэротенках процесс очистки близок к естественным способам очистки, но интенсифицируется путем дополнительного насыщения кислородом. При этом *активный ил* (биоценоз микроорганизмов, с помощью которых осуществляется очистка) свободно плавает в воде в виде хлопьев. В биофильтрах биологическая очистка происходит при участии микроорганизмов, прикрепленных к биопленке. При аэробной очистке протекают интенсивные процессы по минерализации органических веществ различными гетеротрофными микроорганизмами, а также протекает активная нитрификация.

Анаэробная очистка проводится в искусственно создаваемых сооружениях – *метантенках, септиктенках и двухъярусных отстойниках*. В них осуществляется обработка твердой фазы сточных вод (осадков с решеток из первичных отстойников, а также активный ил и биопленка). При анаэробной очистке происходят различные микробиологические процессы (гниение, различные типы брожения). В результате, сложные органические соединения (белки, жиры, углеводы) сточных вод превращаются в жирные кислоты, спирты и газообразные вещества (диоксид углерода, аммиак, метан, водород). Остаток твердой фазы сточных вод, не разрушенный микроорганизмами обезвоживают, сушат и используют в виде удобрения, а спрессованный в виде брикетов – в качестве топлива.

Контрольные вопросы:

1. Что представляет собой экосистема?
2. Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры почвы?
3. По каким микробиологическим показателям проводят санитарную оценку почвы?
4. В каких случаях проводят полный микробиологический анализ

почвы?

5. Охарактеризуйте состав микрофлоры воздуха.
6. Как проводят санитарную оценку воздуха?
7. Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры воды?
8. Что такое «сапробность воды»?
9. Каким образом проводят аэробную очистку сточных вод в искусственных условиях?
10. Какие микробиологические требования предъявляются к питьевой воде?

РАЗДЕЛ II. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

10. Типы биотических взаимоотношений микроорганизмов. Учение об инфекции. Понятие об инфекционном процессе и инфекционной болезни. Патогенность и вирулентность

Основу возникновения и существования биоценозов представляют отношения организмов, их связи, в которые они вступают друг с другом, населяя один и тот же биотоп (местообитание биоценоза, от латинского слово *bios* - жизнь, *top* - место). Эти связи определяют основное условие жизни в сообществе, возможность добывания пищи и освоения нового пространства.

Живые организмы поселяются друг с другом не случайно, а образуют определенные сообщества, приспособленные к совместному обитанию.

Симбиоз (греч. *symbiosis*—совместная жизнь)— различные формы совместного существования разноименных организмов, составляющих симбиотическую систему. В этих системах один из партнеров или оба, в определенной степени возлагают на другого (или друг на друга) задачу регуляции своих отношений с внешней средой. Основой для возникновения симбиоза могут быть трофические, пространственные и другие типы взаимоотношений. Один из партнеров системы или оба вместе приобретают возможность выигрыша в борьбе за существование. Симбиоз бывает *факультативным*, когда каждый из организмов при отсутствии партнера может жить самостоятельно, и *облигатным*, когда один из организмов (или оба) оказывается в такой зависимости от другого, что самостоятельное существование невозможно. По характеру взаимоотношений между партнерами выделяют несколько форм симбиоза: мутуализм, комменсализм и паразитизм.

Мутуализм (от латинского *mutuus* - взаимный). Форма взаимовыгодных отношений видов - от временного, необязательного контакта до симбиоза - неразделимой полезной связи двух видов. Кишечные симбионты участвуют в переработке грубых растительных кормов у многих жвачных животных

Комменсализ, нахлебничество (от латинского *com* - вместе, *mensa* - трапеза) выгоду извлекает один партнер (микроб), не причиняя особого вреда другому

Паразитизм - крайняя форма антагонистического симбиоза, когда микроорганизм питается за счет хозяина, т.е. извлекает выгоду, нанося при этом вред хозяину. Микробный паразитизм носит эволюционный характер. В процессе перехода от свободноживущего к паразитическому типу жизнедеятельности микроорганизмы теряют ряд ферментных систем, необходимых для существования во внешней среде, но приобретают ряд свойств, обеспечивающих возможность паразитизма.

Антагонизм (гр. *antagonisma*—спор, борьба) — термин, применяемый к таким взаимоотношениям между микроорганизмами, когда один вид задерживает или полностью подавляет рост другого. Если угнетение взаимно, говорят об аменсализме (лат. *a* - удаление, отказ и *mensa* - стол, кушание).

Хищничество - такое отношение двух групп организмов, при котором одна использует другую в пищу. Примером может служить род *Clostridium* (патогенные виды), который сначала своими токсинами приводит к гибели животное, а затем использует труп в качестве источника питания

Синтрофия (греч. *syn*—вместе, *trophe*—пища, питание)— способность двух или более видов бактерий осуществлять такой процесс, который ни один из них не может осуществлять по отдельности. Например: группировка в почве микроорганизмов, живущих за счёт листовой подстилки; бактерии, живущие в навозе и перерабатывающие его до органических соединений.

Нейтрализм (лат. *neutralis* - не принадлежащий ни тому, ни другому)— взаимоотношения, при которых микроорганизмы, развиваясь в составе одного ценоза, не оказывают друг на друга непосредственного влияния. Косвенная взаимозависимость организмов при этом неизбежна, поскольку они являются элементами одного сообщества. Например: взаимодействие животных – белка и лось. У микроорганизмов нейтрализм скорее всего будет «условно-нейтральным», т.к. при накоплении в среде продуктов жизнедеятельности со временем будет наблюдаться угнетение роста микроорганизмов.

Конкуренция (лат. *сопсиггеге*—сталкиваться) — взаимоотношения между организмами одного или разных видов,

состязаются за одни и те же ресурсы внешней среды при недостатке последних. Конкуренция может быть пассивной - потребление ресурсов внешней среды, необходимых обоим организмам или активной - подавление одного другим в результате образования определенных продуктов обмена. В микробиологии понятие конкуренции обычно распространяют лишь на взаимоотношения между микроорганизмами, хотя возможны конкурентные отношения между микро- и макроорганизмами, например почвенные микроорганизмы конкурируют с высшими растениями за элементы минерального питания.

Инфекция - совокупность всех биологических, химических и патологических явлений и процессов, возникающих в организме при внедрении и размножении в нем патогенных микроорганизмов.

Виды распространенности инфекций

Место проникновения патогенного микроба в организм животного называют *воротами инфекции*. Ими может являться кожа, слизистая оболочка глаз, дыхательных путей, пищеварительного тракта, мочеполовых путей, у эмбриона - плацента.

Возбудители инфекции эволюционно приспособились к таким путям проникновения в организм, которые обеспечивают наиболее благоприятные условия для размножения и распространения. Ворота инфекции, как правило, разные для каждого вида возбудителя. Одни возбудители имеют строго определенные ворота инфекции (энтеробактерии проникают через желудочно-кишечный тракт, пневмотропные через органы дыхания), другие - множество ворот (при туберкулезе заражение происходит как алиментарно, так и респираторно или через кожу). Знание пути проникновения возбудителя в организм необходимо для правильного проведения профилактики болезни.

Различают следующие виды инфекции.

1. В зависимости от путей проникновения возбудителя различают экзогенную, эндогенную, спонтанную, смешанную, моноинфекцию, вторичную, реинфекцию, суперинфекцию и др.

Экзогенная инфекция - когда возбудитель попадает в организм из окружающей среды.

Эндогенная инфекция (аутоинфекция) возникает в случае ослабления защитных сил здоровых животных, являющихся носителями факультативных микробов-паразитов или условно-

патогенных микробов. Такие микроорганизмы в результате снижения резистентности организма-хозяина становятся вирулентными и вызывают инфекционную болезнь. Эндогенная инфекция при определенных условиях может спровоцировать цепь экзогенных инфекций, т. е. вспышку болезни без заноса возбудителя в хозяйство.

Спонтанная инфекция – инфекция, возникшая естественным путем, без вмешательства человека.

Экспериментальная инфекция – инфекция, воспроизведенная искусственно в процессе эксперимента.

Моноинфекция – инфекция, при которой заболевание вызвано одним возбудителем.

Смешанная инфекция – при участии одновременно двух и более возбудителей.

Вторичная инфекция (секундарная) возникает в случае, когда к основной первичной болезни присоединяется другая, вызываемая новым возбудителем, например, на фоне снижения резистентности.

Реинфекция – это случай, когда после полного клинического выздоровления и освобождения организма животного от возбудителя, оно вновь заболевает в результате нового заражения тем же микроорганизмом.

Суперинфекция – возобновление заболевания животного, не полностью выздоровевшего, при повторном заражении этим же возбудителем.

Рецидивы – это обострение вялотекущей хронической болезни, а периоды между ними называют *ремиссией*.

2. В зависимости от распространения микробов в организме животного различают местную, генерализованную, токсикоинфекцию, бактериемию, септицемию, вирусемию, септикопиемию.

Местная, или очаговая инфекция называется в случае, когда возбудитель остается и размножается в воротах инфекции, например, стафилококкозы, трихофития.

Генерализованная инфекция возникает в том случае, когда микроорганизмы, пройдя через ворота инфекции, распространяются по всему организму.

Токсикоинфекция – это состояние организма, когда возбудитель размножается в месте внедрения, а по всему организму током крови разносятся экзотоксины возбудителя.

Бактериемия (вирусемия) – это вид инфекции, при котором возбудитель (бактерии или вирус) проникает в кровь, но не размножается в ней, а лишь транспортируется в различные органы и ткани, где и размножается.

При *септицемии* размножение микроорганизмов происходит в крови и гематогенным путём обсеменяется микробами весь организм.

Пиемией называют состояние зараженности, когда микроорганизмы лимфогенным путем попадают во внутренние органы и размножаются в них отдельными очагами со скоплением гноя (например, мыт лошадей). Сочетание сепсиса и пиемии называют *септикопиемией*.

Инфекционный процесс – это совокупность физиологических и патологических процессов, возникающих и развивающихся в организме при внедрении в него патогенных микробов, которые вызывают нарушение постоянства его внутренней среды и физиологических функций.

С биологической точки зрения инфекционный процесс является разновидностью паразитизма, когда в борьбу вступают два живых организма, приспособленных к различным воздействиям среды их обитания.

Инфекционная болезнь – это заболевание, обусловленное воздействием на организм человека или животного различных патогенных или условно-патогенных биологических агентов (бактерии, грибки, вирусы, прионы, простейшие), то есть это клиническое проявление воздействия патогена на макроорганизм, характеризуются заразностью, наличием скрытого периода, специфическими реакциями организма на возбудитель и выработкой иммунитета.

Микробоносительство – одна из форм взаимодействия между микро- и макроорганизмом, когда животные не являются больными, отсутствуют признаки заболевания, хотя они являются источником возбудителя инфекции.

Иммунизирующая субинфекция – состояние взаимодействия, когда проникший в организм возбудитель вызывает иммунизаторную реакцию (выработку антител) и в дальнейшем погибают, и организм не становится источником инфекции.

При *развитии инфекционного процесса* можно выделить несколько стадий.

Проникновение инфекционного агента; его адаптация к условиям внутренней среды организма и колонизация тканей, к которым микроорганизм проявляет тропизм.

Образование продуктов жизнедеятельности (токсины, ферменты), оказывающих повреждающее действие и приводящих к нарушению гомеостаза организма.

Распространение инфекционного агента из очага проникновения. Наиболее часто микробы распространяются по лимфатической и кровеносной системе. Для характеристики явлений, связанных с нахождением микроорганизмов или токсинов в крови и лимфе, применяют термины: *бактериемия* (наличие в крови бактерий); *фунгемия* (наличие в крови грибов); *вирусемия* (наличие в крови вирусов); *паразитемия* (наличие в крови простейших).

Бактериемия может сопровождаться клиническими проявлениями либо протекать бессимптомно. Клинически выраженные состояния обычно развиваются при проникновении микроорганизмов в кровь в результате травм, после ветеринарных, хирургических манипуляций либо из инфекционного очага. Пребывание микроорганизмов в крови характерно для многих бактериальных инфекций. Циркуляция микроорганизмов в кровотоке — важная и обязательная стадия патогенеза инфекций, передающихся через укусы членистоногих — переносчиков заболеваний (чума), поддерживающих циркуляцию возбудителя в природе и тем самым сохраняющих его как вид. Важная особенность *бактериемии* — микроорганизмы циркулируют в кровотоке, но не размножаются в нём. Однако уменьшение бактерицидных свойств крови даёт возможность микроорганизмам размножаться в кровотоке, формируя тяжёлые генерализованные формы болезни, известных как *сепсис* [от греч. *sepsis*, гниение. Состояния, при которых микроорганизмы только размножаются в крови, определяют термином *септицемия* [от греч. *sepsis*, гниение, + *haima*, кровь). Состояния, при которых микроорганизм не только размножается в кровотоке, но и формирует новые очаги гнойного воспаления в различных тканях и органах, известны как *септикопиемии* [от греч. *sepsis*, гниение, + /мой, гной, + *haima*, кровь]. Если в патогенезе инфекционного заболевания ведущим звеном служит *интоксикация*, вызванная циркуляцией экзо- или эндотоксинов возбудителя в крови, то такие состояния определяют

термином *токсинеми*. Помимо лимфо- и гематогенного путей распространения возбудителя существует нейрогенный путь.

Естественное окончание инфекционного процесса — гибель или выздоровление больного животного. Выздоровление обычно приводит к развитию не стерильного иммунитета к повторному заражению. Формы инфекционного процесса могут быть разнообразными; далеко не всегда инфекционный процесс проходит все стадии своего развития, так как при попадании патогена в невосприимчивый (иммунный) организм процесс заканчивается на начальных стадиях.

Виды инфекций

Признаки	Виды инфекции
Происхождение	Экзогенная Эндогенная
Расположение возбудителя в организме	Местная (очаговая) Общая (генерализованная)
Количество возбудителей	Моноинфекция Ассоциативная
Порядок включения возбудителя в инфекционный процесс	Секундарная Суперинфекция Реинфекция Рецидив
Распространение возбудителя или его токсинов в организме	Бактеремия Септицемия Пиемия, септикопиемия Токсинеми
Степень распространения	Спорадия Эпизоотия Энзоотия Панзоотия
Возникновение	Спонтанная Экспериментальная

Особенности инфекционных болезней:

1. Наличие специфического возбудителя;
2. Способность распространяться от одного организма другому (заразность);
3. Наличие инкубационного периода;
4. Формирование в организме иммунитета

По способности вызывать инфекционный процесс различают микробы:

- Патогенные;
- Непатогенные;
- Условно – патогенные.

Условно-патогенные организмы — это естественные обитатели различных биотопов организма человека и животных, вызывающие заболевания при резком снижении общего или местного иммунитета.

К условно-патогенным микроорганизмам относят представителей семейства кишечной палочки, различные виды стрептококков, стафилококков, энтерококки, псевдомонады и многие другие микроорганизмы.

Условно-патогенная микрофлора является достаточно опасной для организма животного, но бороться с ней, и пытаться вовсе ее исключить из организма животного, было бы неправильно и даже опасно для него. Поэтому целесообразно проводить бактериологическое исследование с целью определения патогенности и антибиотикорезистентности выделенных культур и создавать такие оптимальные условия для животного, чтобы эти организмы приносили ему только пользу и участвовали в поддержании здорового состояния животного. В борьбе с условно-патогенной микрофлорой большое значение имеет повышение естественной резистентности организма животного

Патогенность и вирулентность микроорганизмов

Патогенность (“рождающий болезнь”) - способность микроорганизма вызвать заболевание. Это свойство характеризует видовые *генетические* особенности микроорганизмов, их генетически детерминированные характеристики, позволяющие преодолеть защитные механизмы хозяина, проявить свои патогенные свойства.

Вирулентность - фенотипическое (индивидуальное) количественное выражение патогенности (патогенного генотипа), т.е. степень патогенности.

Вирулентность может варьировать и может быть определена лабораторными методами (чаще - LD50 - 50% летальная доза- количество патогенных микроорганизмов, позволяющая вызвать гибель 50% зараженных животных).

Измерение вирулентности

- DLM (dosis letalis minima) – минимальное количество возбудителя, вызывающая гибель животных (количество возбудителя, вызывающая гибель 80% животных).

- DCL (dosis certa letalis) – количество возбудителя, вызывающая гибель 100% животных.

- LD50 - 50% летальная доза- количество патогенных микроорганизмов, позволяющая вызвать гибель 50% зараженных животных

- ID (inficio dosis)– количество возбудителя, вызывающая инфекционное заболевание у животных.

Инфекция - совокупность всех биологических, химических и патологических явлений и процессов, возникающих в организме при внедрении и размножении в нем патогенных микроорганизмов.

Факторы, влияющие на распространение инфекции:

- Степень вирулентности микроба
- Иммунологическая память макроорганизма
- Условия внешней среды

Инфекционные заболевания характеризуются цикличностью, сменой периодов.

1. *Инкубационный период* - от момента заражения до первых клинических признаков (процесс активного размножения возбудителя).

2. *Продромальный период* (предвестников) характеризуется общими неспецифическими проявлениями- недомоганием, головной болью, повышением температуры и другими симптомами преимущественно токсического генеза.

3. *Период развития (разгара)* болезни характеризуется типичными (специфическими) для данной инфекции клиническими проявлениями.

4. *Период реконвалесценции* (выздоровления). В качестве исхода болезни может наступить выздоровление, развиваться носительство или летальный исход.



ИП – инкубационный период; **ПП** – продромальный период; **КП** – клинический период; **ПР** – реконвалесценция

Рис.17. Динамика инфекционного процесса. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Основные этапы инфекционного процесса:

1. *Адгезия*- прикрепление микроорганизма к соответствующим клеткам хозяина.

2. *Колонизация*- закрепление микроорганизмов в соответствующем участке.

3. *Размножение* (увеличение количества- мультипликация).

4. *Пенетрация* - проникновение в нижележащие слои и распространение инфекта.

5. *Повреждение* клеток и тканей (связано с размножением, пенетрацией и распространением инфекта).

Инфекционный процесс может быть:

- по длительности - *острый и хронический*.

- по степени распространения - *локальный и генерализованный*.

- по выраженности - *манифестный и инapparантный*.

Факторы внешней среды и свойства макроорганизма, влияющие на возникновение и развитие инфекционного процесса:

- Возраст животного;

- Порода животного;
- Кормление, рацион;
- Режим поения;
- Физическая нагрузка;
- Зоогигиеническое состояние;
- Физические факторы (изменение температуры);
- Сезон года;
- Влияние солнечных, рентгеновских и радиоактивных лучей.

Основные факторы патогенности микроорганизмов - адгезины, ферменты патогенности, подавляющие фагоцитоз вещества, микробные токсины, в определенных условиях - капсула, подвижность микробов. Вирулентность связана с *токсигенностью* (способностью образования токсинов) и *инвазивностью* (способностью проникать в ткани хозяина, размножаться и распространяться). Токсигенность и инвазивность имеют самостоятельный генетический контроль, часто находятся в обратной зависимости (возбудитель с высокой токсигенностью может обладать низкой инвазивностью и наоборот).

Патогенность - способность микроорганизма вызывать заболевание - *более широкое понятие, чем паразитизм*. Патогенными свойствами могут обладать не только паразитические виды микробов, но и свободно живущие, в т.ч. возбудители сапронозов (иерсинии, легионеллы и др.). Естественной средой для последних является почва и растительные организмы, однако они способны перестраивать свой метаболизм в организме теплокровных животных и оказывать патогенное действие.

Обеспечивают внедрение патогена в организм, прикрепление к специфическим клеткам, тканям, органам, создают условия для внутриклеточного размножения, подавляют иммунную систему, вызывают интоксикацию организма.

Инвазия - способность микроорганизма проникать, распространяться

и размножаться в тканях и органах макроорганизма

Колонизация - закрепление микроорганизмов в соответствующем участке

Размножение - увеличение количества микробных клеток (мультипликация).

Пенетрация - проникновение в нижележащие слои и распространение инфекта. Повреждение клеток и тканей (связано с размножением, пенетрацией и распространением инфекта).

Адгезия - пусковой механизм реализации патогенных свойств возбудителей. *Антифагоцитарная активность* (капсула и другие поверхностные структуры бактерий, проявляющие антифагоцитарное действие) – защищает бактерию от фагоцитов. Функцию адгезии выполняют пили, белки наружной мембраны, ЛПС, тейхоевые кислоты.

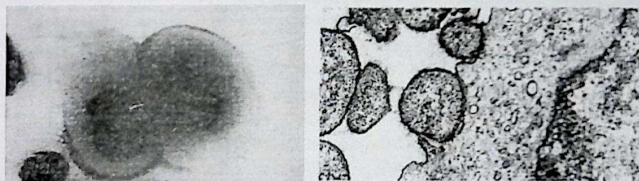


Рис.18. Адгезия бактерии. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Экзотоксины продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. По своей химической структуре это белки. По механизму действия экзотоксина на клетку различают несколько типов: цитотоксины, мембранотоксины, функциональные блокаторы, эксфолианты и эритрогемины. Механизм действия белковых токсинов сводится к повреждению жизненно важных процессов в клетке: повышение проницаемости мембран, блокады синтеза белка и других биохимических процессов в клетке или нарушении взаимодействия между клетками. *Экзотоксины* являются сильными антигенами, которые и индуцируют образование в организме антитоксинов.

По молекулярной организации экзотоксины делятся на две группы:

- *экзотоксины*, состоящие из двух фрагментов;
- *экзотоксины*, составляющие единую полипептидную цепь.

По степени связи с бактериальной клетки экзотоксины делятся условно на три класса.

- *Класс А* - токсины, секретируемые во внешнюю среду;

- *Класс В* - токсины частично секретируемые и частично связанные с микробной клеткой;

- *Класс С* - токсины, связанные и с микробной клеткой и попадающие в окружающую среду при разрушении клетки.

Экзотоксины обладают высокой токсичностью. Под воздействием формалина и температуры экзотоксины утрачивают свою токсичность, но сохраняют иммуногенное свойство. Такие токсины получили название *анатоксины* и применяются для профилактики заболевания столбняка, гангрены, ботулизма, дифтерии, а также используются в виде антигенов для иммунизации животных с целью получения анатоксических сывороток.

Эндотоксины по своей химической структуре являются липополисахаридами, которые содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Эндотоксины не обладают специфичностью, термостабильны, менее токсичны, обладают слабой иммуногенностью. При поступлении в организм больших доз эндотоксины угнетают фагоцитоз, гранулоцитоз, моноцитоз, увеличивают проницаемость капилляров, оказывают разрушающее действие на клетки. Микробные липополисахариды разрушают лейкоциты крови, вызывают дегрануляцию тучных клеток с выделением вазодилататоров, активируют фактор Хагемана, что приводит к лейкопении, гипертермии, гипотонии, ацидозу, диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (ДВК).

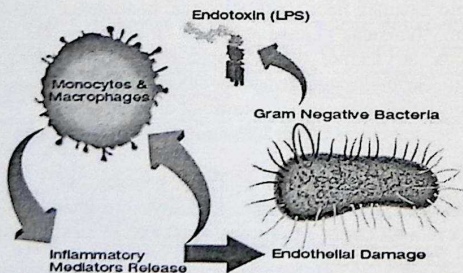


Рис.19. Синтез эндотоксина. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Эндотоксины стимулируют синтез интерферонов, активируют систему комплемента по классическому пути, обладают аллергическими свойствами.

При введении небольших доз эндотоксина повышается резистентность организма, усиливается фагоцитоз, стимулируются В-лимфоциты. Сыворотка животного иммунизированного эндотоксином обладает слабой антитоксической активностью и не нейтрализует эндотоксин.

Патогенность бактерий контролируется тремя типами генов: гены - собственной хромосомы, гены, привнесенные плазмидами и умеренными фагами.

Контрольные вопросы:

1. Каковы виды биологических взаимоотношений микроорганизмов?
2. Что такое симбиоз, комменциализм?
3. Что такое мутуализм, нейтролизм?
4. Что такое антогинизм, паразитизм?
5. Что такое синторфия, хищничество?
6. Что такое инфекция?
7. Что такое инфекционный процесс?
8. Что такое инфекционное болезнь?
9. Что такое микробоносительство?
10. Что такое токсины?
11. Как насчет экзотоксины и эндотоксины?
12. Какие группы токсинов выделяются по химическому составу?
13. Назовите виды инфекций?
14. Что такое суперинфекция, рецидив?
15. Опишите вторую (вторую) инфекцию, скрытые инфекции?
16. Как различаются инфекции в зависимости от происхождения?
17. Как распространяется инфекция из-за длительных инфекций

11. Иммуитет. Виды иммуитета. Врожденный (неспецифические) факторы защиты организма

Иммуитет (лат. *immunitas*) — это способ защиты организма от действия различных веществ и организмов, вызывающих деструкцию его клеток и тканей, характеризующийся изменением функциональной активности преимущественно иммуоцитов с целью поддержания гомеостаза внутренней среды.

Виды иммуитета.

- Врожденный (неспецифический, наследственный) иммуитет, т.е. устойчивость организма к антигенам.

- Адаптивный (устар. приобретенный, специфический) иммуитет, способность распознавать и реагировать на индивидуальные антигены, где, вовлекаются лимфоидные клетки, имеется иммунологическая память, возможна аутоагрессия.

Классифицируют на активный и пассивный.

- Приобретенный активный иммуитет возникает после перенесенного заболевания или после введения *вакцины*.

- Приобретенный пассивный иммуитет развивается при введении в организм готовых антител в виде *сыворотки* или передаче их новорожденному с *молозивом* матери или внутриутробным способом.

Другая классификация разделяет иммуитет на естественный и искусственный.

Естественный иммуитет включает врожденный иммуитет и приобретенный активный (после перенесенного заболевания), а также пассивный иммуитет при передаче антител ребенку от матери.

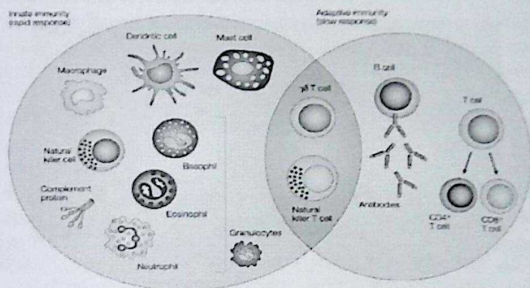
Искусственный иммуитет включает приобретенный активный после прививки (введение вакцины) и приобретенный пассивный (введение сыворотки).

Специфические и неспецифические факторы защиты организма нельзя рассматривать изолированно, так как они функционируют во взаимодействии, составляя единую целостную систему защиты организма от антигенов.

Однако они могут включаться в *процесс защиты* не одновременно и не все сразу.

В зависимости от *характера антигенного воздействия* ведущими могут быть или одна, или несколько форм реагирования,

некоторые при этом могут не проявляться. В этом заключается многообразие, экономность и эффективность действия иммунной системы.



Nature Reviews | Cancer

Рис.20. Неспецифические и специфические факторы защиты организма. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Врождённый (неспецифический, наследственный) иммунитет обусловлен способностью сопоставлять и обезвреживать разнообразные патогены по наиболее консервативным, общим для них признакам, дальности эволюционного родства, до первой встречи с ними.

Открытие врожденного иммунитета многие эксперты часто называют революцией в иммунологии. Оказалось, что именно он является "главным" для всех живых существ. У эволюционно продвинутых организмов, в том числе человека, существует также приобретенный (адаптивный) иммунитет, но врожденный регулирует его работу.

Иммунная система позволяет человечеству существовать в мире, полном патогенных микроорганизмов — вирусов, бактерий, грибов.

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2011 года вручена за открытия в области активации врожденного иммунитета (половину премии разделили Брюс Бётлер и Жюль Хоффман) и за изучение роли дендритных клеток в приобретенном иммунитете (вторая половина премии присуждена Ральфу Стайнману, к

сожалению, скончавшемуся 30 сентября от рака). Эти достижения не только дали понимание того, как слаженная работа врожденного и адаптивного иммунитета защищает организм, но и открыли новые перспективы в лечении инфекций, рака и воспалительных

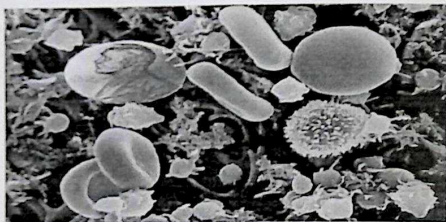


Рис.21. Человеческая кровь содержит большинство клеточных и неклеточных факторов, определяющих иммунитет к бактериальным инфекциям. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Врожденный (неспецифический, наследственный) факторы иммунитета осуществляется большей частью клетками миелоидного ряда, не имеет строгой специфичности к антигенам, не имеет клонального ответа, не обладает памятью о первичном контакте с чужеродным агентом.

Неспецифические факторы защиты (или врожденный иммунитет) включают:

1. Анатомо-физиологические барьеры организма,
2. Физико - химические барьеры,
3. Иммунологические барьеры.

Анатомо-физиологические барьеры организма. К ним относятся *кожа и слизистые оболочки*, которые механически защищают организм от проникновения в него антигенов (бактерий, вирусов, макромолекул). Эту же роль выполняют слизь и реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей.

Физико-химические барьеры. К ним относятся *ферменты, соляная кислота* желудочного сока, *жирные кислоты и альдегиды* потовых и сальных желез кожи. Они разрушают попадающие в организм антигены. Секреты потовых и сальных желез обладают бактерицидным действием вследствие наличия в них уксусной, муравьиной, молочной кислот. В кишечнике мощными

инактивирующими факторами служат *желчь*, ферменты поджелудочной железы и *нормальная микрофлора*, которая выделяет *бактериоцины* – вещества наподобие антибиотиков, угнетающие патогенные виды микробов.

Иммунобиологические барьеры. Осуществляют *неспецифические факторы клеточного иммунитета*: фагоцитоз; естественные клетки-киллеры (НК); местный воспалительный процесс и *неспецифические факторы гуморального иммунитета*: система комплемента, лизоцим, интерферон, защитные белки крови.

Неспецифические факторы клеточного иммунитета

Фагоцитоз — процесс, при котором специально предназначенные фагоциты захватывают и переваривают возбудителей и отмершие клетки *фагоцитами*. К фагоцитирующим клеткам относится *макрофаги* и *микрофаги*. К макрофагам относятся тканевые макрофаги (альвеолярные, перитонеальные), глубокие клетки кожи, клетки Купфера, моноциты крови; к микрофагам – нейтрофилы крови. В настоящее время все фагоциты объединены в единую моноклеарную фагоцитирующую систему.

Функции фагоцитов обширны:

- удаляют из организма отмирающие клетки и их структуры,
- удаляют неорганические вещества, пыль и. т. д.,
- поглощают микробы и их инактивируют (бактерии, вирусы, грибы),
- участвуют в регуляции иммунной системы.

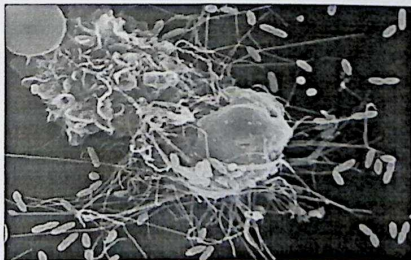


Рис.22. Процесс фагоцитоза. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Фагоциты с одной стороны, очищают организм от всех инородных агентов в независимо от природы их происхождения, а с другой, участвуют в процессе формирования специфического иммунитета путем презентации антигена -Т и -В -лимфоцитам и в регуляции активности этих клеток (макрофаги).

Процесс фагоцитоза состоит несколько стадий:

1. Хемотаксис
2. Адсорбция объекта на поверхности фагоцита.
3. Поглощение объекта фагоцитом.
4. Переваривание объекта происходит с помощью лизосомальных ферментов.

Различают *завершенный фагоцитоз*, когда происходит полное перевариванием микробов и его презентация-Т и -В -лимфоцитам и *не завершенный фагоцитоз*, когда поглощенные микробы не погибают или не полностью перевариваются (вирусная инфекция, возбудитель туберкулеза).

Естественные клетки киллеры (NK-клетки) - служат в качестве самой ранней защиты против вторжения «чужаков» (бактерий, вирусы) или появления «оборотней-перерожденцев» (опухолевые клетки) внутри организма.

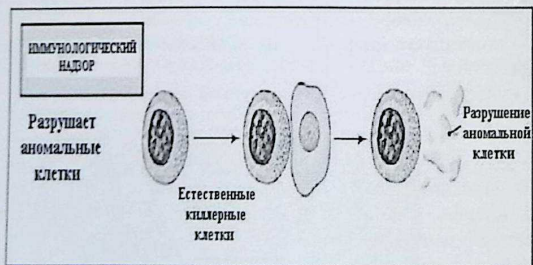


Рис.23. Процесс разрушения аномальных клеток. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Воспалительный процесс. Воспаление как защитная реакция организма на раздражение и повреждение ткани различными антигенами (физическими, химическими, биологическими)

возникло на более высокой ступени эволюции, чем фагоцитоз (а именно у организмов, обладающих кровеносной и нервной системой). Помимо фагоцитоза, который является обязательным компонентом воспалительной реакции, в ней действуют и другие механизмы защиты, благодаря которым в очаге воспаления происходит фиксация, уничтожение микроорганизмов или других инородных веществ.

Неспецифические факторы гуморального иммунитета – набор веществ, которые помогают противостоять многочисленным видам вредоносных элементов, попадающих в организм. К ним относят: **Муцин** – содержащий углеводы и белки секрет слюнных желез, защищающий от токсинов, бактерий.

Лизоцим – протеолитический фермент, который синтезируется макрофагами, нейтрофилами и другими фагоцитирующими клетками и постоянно поступает в жидкости и ткани организма. Фермент содержится в крови, лимфе, слезах, молоке, сперме, на слизистых оболочках дыхательных путей, ЖКТ, мочеполовых путей. Лизоцим разрушает клеточную стенку грамположительных бактерий, что приводит к их лизису и способствует фагоцитозу.

Пропердин (лат. pro и perdere — подготовить к разрушению) - был обнаружен Пиллимером в сыворотке крови. Это белок-глобулин, который в сочетании с комплементом и ионами магния губительно действует на бактерии и инактивирует некоторые вирусы. Снижение уровня пропердина в сыворотке крови человека при инфекционных заболеваниях, облучении, шоке считается неблагоприятным признаком. Стимулирует клеточное звено иммунитета; Активизирует выработку цитокинов.

Цитокины – белковые соединения, которые вырабатываются клетками тканей.

Интерферон - группа низкомолекулярных белков, вырабатываемых клеткой под действием индуктора.

В зависимости от того, какими клетками синтезируется интерферон, различают 3 его вида: α -, s-, γ -интерферон.

α -интерферон вырабатывается лейкоцитами и называется лейкоцитарным.

s-интерферон (фибробластный) синтезируется фибробластами - клетками соединительной ткани.

γ -интерферон (иммунный) - вырабатывается Т - лимфоцитами.

Система комплемента называют многокомпонентную систему белков сыворотки крови и других жидкостей организма, которые играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза.

Комплемент (от лат. complementum — дополнение), или лексин (от греч. alexo —защищаю), обнаружен почти во всех жидкостях организма, кроме спинно-мозговой и жидкости передней камеры глаза. Он обладает способностью лизировать, растворять, некоторые бактерии, поэтому его называют еще а-лизин. Действие комплемента особенно активно проявляется в присутствии ионов магния и кальция, а также в сочетании с антителами. Комплемент в присутствии специфических антител способен лизировать бактерии (бактериолиз), например вибриона, сальмонелл, шигелл. Присоединяясь к комплексу эритроцит — антитело, комплемент гемолизует эритроциты. Содержание комплемента в крови человека довольно постоянно. Очень много его в сыворотке морской свинки. Он нестойк и разрушается при нагревании до 55°C в течение 30 мин, а также при длительном хранении, продолжительном встряхивании, под действием кислот и ультрафиолетовых лучей. Комплемент длительно сохраняется в высушенном состоянии при низкой температуре.

Комплемент — сложная система, состоящая из 11 сывороточных протеинов (C1, C2, C3, C4 и т. д.). В результате активации различных компонентов этой системы происходят важные биологические процессы, способствующие фагоцитозу.

Защитные белки сыворотки крови — протеины, участвующие в защите организма от микробов и других антигенов:

- **белки острой фазы** (С-реактивный белок - вырабатывается в печени в ответ на повреждение тканей и клеток, является индикатором воспаления).

- **фибринектин** - универсальный белок плазмы крови и тканевых жидкостей, синтезируемый макрофагами.

- **s-лизины** - белки сыворотки крови, синтезируемые тромбоцитами, повреждают цитоплазматическую мембрану бактерий.

Таким образом, факторы неспецифической защиты организма нейтрализуют любые антигены независимо от их природы и характера. Они не имеют специфической направленности действия применительно к конкретному антигену и первыми встают на их

пути. Если антигены преодолевают неспецифические факторы защиты, тогда начинает функционировать иммунная система, распознающая антиген и включающая специфические реакции, направленные на обезвреживание антигена.

Наиболее мощными факторами гуморальной защиты являются специфические белки — так называемые антитела, которые вырабатываются организмом при проникновении в него каких-либо чужеродных агентов (антигены).

12. Иммунная система организма. Система Т и В-лимфоцитов и макрофагов.

Важная функция иммунной системы выполнять функцию *иммунного надзора* за постоянством внутренней среды организма, защиты от появления генетически чужеродных молекул и клеток. Принцип ее действия основан на распознавании «свой - чужой».

Иммунная система состоит из *лимфоидной ткани*. Это специализированная, анатомически обособленная ткань, разбросанная по всему организму в виде различных лимфоидных образований. Суммарная масса этой ткани составляет 1 -2 % массы тела.

Функциональной клеткой иммунной системы являются **лимфоциты**, которые подразделяются на Т- и В- лимфоциты, и фагоциты.

Анатомически иммунная система подразделена на *центральные и периферические органы*. К *центральному органу* относят *красный костный мозг* и *тимус*, а к *периферическим* — *селезенку, лимфатические узлы*, а также местноассоциированную лимфоидную ткань: бронхассоциированную (БАЛТ), кожноассоциированную (КАЛТ), кишечнoассоциированную (КИЛТ, пейеровы бляшки).

Красный костный мозг — центральный орган кроветворения и иммуногенеза. Содержит самоподдерживающуюся популяцию стволовых клеток. Красный костный мозг находится в ячейках губчатого вещества плоских костей и в эпифизах трубчатых костей. Здесь происходит дифференцировка **В-лимфоцитов** из предшественников. Содержит также **Т-лимфоциты**.

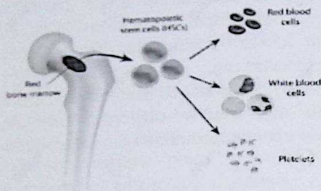


Рис.24. Костный мозг – «фабрика» клеток. Заимствовано из Интернет-ресурсов

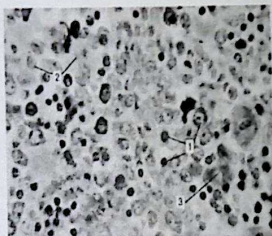


Рис.25. 1-клетки гемоцитопозитических рядов; 2 - ретикулярная клетка; 3 - мегакариоцит. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В красном костном мозге имеются стволовые кроветворные клетки - предшественники всех клеток крови и иммунной системы (лимфоцитов).

Миелоидные клетки в костном мозге составляют 60–65% клеток. Лимфоидные - 10-15%. Незрелые клетки составляют 60% клеток от всех клеток костного мозга, остальные - созревшие или вновь поступившие в костный мозг.

Ежедневно из костного мозга на периферию мигрирует около 200 млн клеток, что составляет 50% от их общего количества. В костном мозге образуются и полностью *дифференцируются*: *эритроциты*, *тромбоциты*, *гранулоциты* (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы). *Моноциты* завершают созревание в крови; поступая затем в ткани, превращаются в *тканевые макрофаги*. Предшественники Т-лимфоцитов из костного мозга мигрируют в тимус, где формируются *Т-хелперы* и *Т-киллеры*. *В-клетка* проходит основные этапы становления в костном мозге. Здесь формируются: *ранняя и поздняя про-В-клетки*, *пре-В-клетки*, *незрелая и зрелая В-клетка*.

Процесс дифференцировки включает:

1). Реанжировку (перестройку) генов цепей Ig, формирующих В-клеточный рецептор с коэкспрессией на клеточной мембране его двух типов IgM и IgD.

2). Активацию генов, обеспечивающих мембранную экспрессию ряда молекулярных структур, необходимых для эффективного прохождения внутриклеточного сигнала от взаимодействующего с антигеном (АГ) рецептора к ядру клетки;

3). Развитие толерантности к собственным антигенам (АГ).

Из костного мозга зрелые В-клетки мигрируют в периферические органы иммунитета, где участвуют в формировании иммунного ответа

Тимус — центральный орган иммунной системы. В нём происходит дифференцировка Т-лимфоцитов из предшественников, поступающих из красного костного мозга. Тимус начинает развиваться на 4-5-й неделе эмбриогенеза.

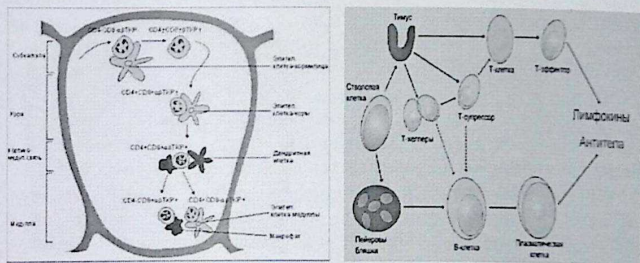


Рис.26. Дифференцировка Т-лимфоцитов в тимусе. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Тимус имеет дольчатое строение, в ткани дольки различают корковое вещество, расположенное на периферии дольки, и мозговое вещество

Непосредственно под капсулой в клеточном составе преобладают делящиеся Т-лимфобласты. Далее созревающие Т-лимфоциты, постепенно мигрирующие к мозговому веществу. В ходе созревания происходит реаранжировка генов и формирование гена ТкР.

В мозговом веществе в основном содержатся дозревающие Т-лимфоциты. Отсюда они мигрируют в кровоток по организму.

Предполагается также наличие здесь зрелых рециркулирующих Т-лимфоцитов.

В тимус незрелые Т-клетки поступают, не имея на мембране маркеров Т-клеток: CD3, CD4, CD8, ТКР. На ранних стадиях созревания на их мембране появляются все вышеуказанные маркеры, затем клетки размножаются и проходят два этапа селекции:

1. *Позитивная селекция* - отбор Т-клеток по способности распознавать чужеродные АГ, презентированные в комплексе с МНС. Клетки, не способные распознавать данный комплекс, погибают путем апоптоза. Выжившие тимоциты теряют один из Т-клеточных маркеров - или CD4, или CD8 молекул.

2. *Негативная селекция* - элиминация потенциально аутореактивных клеток, т.е. клеток, чей рецептор способен распознавать антигены собственного организма. Негативная селекция закладывает основы формирования толерантности, т.е. неответственности иммунной системы на собственные антигены.

В тимусе после двух этапов селекции выживает всего 2% тимоцитов. Выжившие тимоциты мигрируют в мозговой слой и затем выходят в кровь, превращаясь в «наивные» Т-лимфоциты.

Лимфатические узлы - периферические органы иммунной системы. Они располагаются по ходу лимфатических сосудов. В каждом узле выделяют корковое и мозговое вещество. В корковом веществе есть В-зависимые зоны и Т-зависимые зоны. В мозговом есть только Т-зависимые зоны. *Лимфа* — жидкая ткань организма, которая содержится в лимфатических сосудах и узлах. Она включает в себя все соединения, поступающие из межтканевой жидкости. *Основными и практически единственными клетками лимфы являются лимфоциты.* В ее составе эти клетки осуществляют кругооборот в организме.

Селезёнка — паренхиматозный зональный орган. Является самым крупным органом иммунной системы, кроме того, выполняет депонирующую функцию по отношению к крови. Селезёнка покрыта капсулой из плотной соединительной ткани, которая содержит гладкомышечные клетки, позволяющие ей при необходимости сокращаться. *Паренхима селезенки представлена двумя функционально различными зонами: белой и красной пульпой. Белая пульпа составляет 20 %, представлена лимфоидной тканью.* Здесь имеются В-зависимые и Т-зависимые зоны. И также

здесь есть *макрофаги*. Красная пульпа составляет 80 %. Она выполняет следующие функции:

- Депонирование зрелых форменных элементов крови.
- Контроль состояния и разрушения старых и повреждённых эритроцитов и тромбоцитов.
- Фагоцитоз инородных частиц.
- Обеспечение дозревания лимфоидных клеток и превращение моноцитов в макрофаги.

Кровь относится к периферическим органам иммунитета. В ней циркулируют Т- и В- лимфоциты.

Иммунокомпетентные клетки.

Родоначалницей всех клеток крови, в том числе и лимфоцитов, является *стволовая клетка* костного мозга, которая при дифференцировке и пролиферации может превращаться в предшественников Т- и В-лимфоцитов. Предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус, где под влиянием тимозина созревают и дифференцируются, образуя разновидности лимфоцитов: Т-хелперы, Т-супрессоры, Т- эффекторы (киллеры). Предшественники В- лимфоцитов мигрируют в костный мозг, где превращаются в костно - мозговые В-лимфоциты, которые переходят в плазматические клетки, продуцирующие антитела.

Характеристика иммунокомпетентных клеток.

Основные клетки иммунной системы — лимфоциты и фагоциты, а также гранулоциты и моноциты крови.

По функциональной активности иммунокомпетентные клетки подразделяют на *регуляторные и эффекторные*. *Регуляторные клетки* «управляют» функцией иммунной системы путем выработки медиаторов — иммуноцитокінов. *Эффекторные клетки* являются исполнителями иммунного реагирования. Они действуют на объект также путем биосинтеза биологически активных веществ (БАВ).

Фагоциты - самая многочисленная часть иммунокомпетентных клеток, различная по морфологическим свойствам. Фагоциты обладают регуляторной и эффекторной активностью, вырабатывают иммуноцитокіны, ферменты и другие БАВ, обеспечивает вне- и внутриклеточное разрушение антигена, фагоцитоз, а макрофаги также переработку и представление антигена Т- хелперам, репарацию тканей.

Лимфоциты — подвижные мононуклеарные клетки, которые в зависимости от места созревания подразделяются на Т- и В-лимфоциты.

Лимфоциты непосредственно распознают генетически чужеродные молекулы и участвуют в регуляции иммунного ответа, формировании гуморального и клеточного иммунитета, иммунологической толерантности и памяти, реакциях гиперчувствительности. Лимфоциты постоянно циркулируют между различными органами и тканями.

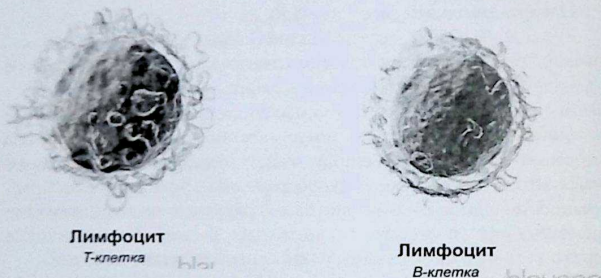


Рис.27. Т- и В-лимфоциты. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В-лимфоциты - это эффекторные иммунные клетки, ответственные за синтез антител — иммуноглобулинов, обеспечивают гуморальный иммунный ответ. Также участвуют в презентации антигена, гиперчувствительности немедленного типа. Активностью В-лимфоцитов управляют молекулярные антигены, Т-хелперы, макрофаги и другие антигенпрезентирующие клетки.

Т-лимфоциты - сложная популяция лимфоидных клеток, отвечающая главным образом за клеточный иммунный ответ. Включает в себя субпопуляции Т-хелперов (дополнительно разделяются на Th1, Th2, а также выделяют Th3, Th9, Th17, Th22, Treg), цитотоксических Т-лимфоцитов, NKT. Включает в себя эффекторы, регуляторы и долгоживущие клетки-памяти. Функции разнообразны: как регуляторы и администраторы иммунного ответа (Т-хелперы), так и киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты). Т-

лимфоциты обеспечивают клеточные формы иммунного ответа, определяют силу и продолжительность иммунной реакции.

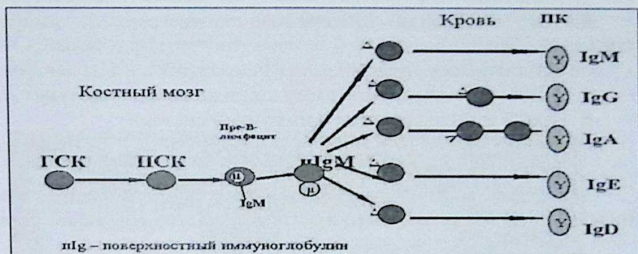


Рис.28. Этапы развития В-лимфоцитов. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Т-киллеры (клетки-убийцы) — субпопуляция клеток-эффекторов, на долю их приходится 25% всех Т-лимфоцитов. Они ответственны за клеточный иммунитет в различных его проявлениях: разрушают чужеродные клетки, мутированные клетки собственного организма, участвуют в ГЧЗТ, разрушают клетки-мишени, в частности инфицированные вирусами и бактериями при непосредственном контакте за счет выделяемых ферментов -токсинов.

Т-хелперы (помощники) выполняют регуляторную сигнальную функцию, передавая информацию об антигенах Т- и В-лимфоцитам. Т-хелперы синтезируют цитокины (интерлейкины, γ -интерферон и др.), с помощью которых активируют Т- и В-лимфоциты, включают созревание, размножение и дифференцировку клеток-эффекторов В присутствии хелперов синтез антител увеличивается 2-3 раза. На поверхности Т-хелперов содержится рецептор CD4, поэтому по международной номенклатуре их обозначают как CD4-лимфоциты. Имеются также *0-клетки* («нулевые»), на поверхности которых нет маркеров, присущих Т- и В-лимфоцитам, и *NK-клетки* (естественные киллеры), которые играют важную роль в противоопухолевом иммунитете и противодействуют внутриклеточной инфекции.

Контрольные вопросы:

1. Что такое иммунная система в организме?
2. Что относится к центральным органам иммунной системы?
3. Что относится к периферическим органам иммунной системы?
4. Что такое иммунокомпетентные клетки?
5. Дайте характеристику иммунокомпетентным клеткам
6. Роль Т и В лимфоцитов в иммунной системе

13. Адаптивный (приобретенный, специфический) иммунитет. Механизм иммунного ответа. Антигены, антитела.

Иммунитет - система реакций, призванная защитить организм от вторжения бактерий, вирусов, грибов, простейших и других вредоносных агентов — так называемых патогенов.

Специфические факторы защиты (или адаптивный иммунитет) включают:

- Клеточный иммунитет
- Гуморальный иммунитет.

Иммунология считается сегодня самой перспективной наукой и на результаты исследований в этой области ученые возлагают большие надежды, поскольку нет лучшей защиты от болезней, чем безупречно работающий естественный, придуманный природой механизм защиты организма. Что же придумала природа для защиты организма от патогенов?

Это клеточные и гуморальные факторы защиты, часто они носят название «клеточный иммунитет» и «гуморальный иммунитет».

Клеточные факторы защиты или **клеточный иммунитет** направлен на уничтожение патогенных клеток с помощью групп клеток, которые ведут себя агрессивно при встрече с чужеродными клетками или опухолевыми клетками. Агрессия заключается в уничтожении путем фагоцитоза (заглатывание и внутриклеточное разрушение - «переваривание»). К таким клеткам относятся лейкоциты (гранулоциты, моноциты). Это клетки врожденного (неспецифического) иммунитета. А так же в процессе клеточной защиты участвуют клетки Т-лимфоциты, которые являются представителями приобретенного (специфического иммунитета).

Клеточный иммунитет представлен различными популяциями *T- и В-лимфоцитов*, соотношение которых играет важную роль в оценке состояния этого звена иммунитета. Их родоначальником являются стволовые лимфоидные клетки, в последующем дифференцирующиеся (превращающиеся) в тимусе в *T-лимфоциты*, а в костном мозге — и *В-лимфоциты* (в этих органах происходит созревание лимфоцитов).



Рис.29. Клеточные факторы адаптивного иммунитета

В состав *T-лимфоцитов* входят клетки, выполняющие различные функции в иммунном ответе. Одни *T-лимфоциты* помогают определенным *В-лимфоцитам* вырабатывать специфические антитела к антигенам. Они получили название *T-лимфоцитов-помощников* или *хелперов* (от англ. help — помощь). Другие лимфоциты принимают активное участие в развитии аллергических реакций — *T-лимфоциты - эффекторы*. Наконец, третья группа лимфоцитов — *T-лимфоциты - супрессоры*, участвует в подавлении иммунных реакций. В настоящее время известны и многие другие популяции *T-лимфоцитов*.

T-лимфоциты несут на своей поверхности маркеры — антигены. *T-лимфоциты* выступают в роли первичных стимуляторов *В-лимфоцитов* и моноцитов крови, тканей. Это

достигается либо посредством выделения ими гуморальных факторов (интерлейкинов и лимфокинов), либо путем прямого контакта с В-клетками.

Гуморальный иммунитет. В-клетки называют костномозговыми, так как стволовые клетки костного мозга, взаимодействуя с клеточным микроокружением, трансформируются в В-лимфоциты непосредственно в костном мозге. Согласно современным представлениям, развитие В-лимфоцитов проходит несколько стадий от стволовой клетки к ранним и поздним предшественникам и, наконец, к зрелой клетке. В-лимфоциты участвуют в выработке антител, В-лимфоциты, в отличие от Т-лимфоцитов, служат основными клетками, обеспечивающими формирование гуморального иммунитета. В процессе иммунного ответа они дифференцируются в плазматические клетки, способные синтезировать антитела — иммуноглобулины.



Рис.30. Гуморальные факторы адаптивного иммунитета

В-лимфоциты ведут «фиксированный образ жизни», в основном в периферических лимфоидных органах.

Зрелые Т-лимфоциты мигрируют с кровотоком во вторичные лимфоидные органы, лимфатические узлы. В лимфатических узлах

в ответ на контакт с любым антигенным стимулом (например, бактериями) происходят активация и пролиферация Т-лимфоцитов с преимущественным размножением определенного клона клеток, имеющего рецепторы к внедрившимся антигенам. Резкое увеличение специфического клона Т-лимфоцитов отмечается на 7—9-е сутки при первичном иммунном контакте с чужеродным антигеном или на 4—5-е сутки при вторичном иммунном контакте.

Т-лимфоциты выполняют в организме две важные функции: *эффекторную и регуляторную*. *Эффекторная функция* Т-лимфоцитов состоит в уничтожении специфических чужеродных клеток и антигенов. Главными исполнителями этой функции являются цитотоксические Т-лимфоциты (Т-супрессоры). *Регуляторная функция* (система Т-хелперы—Т-супрессоры) состоит в контроле за интенсивностью развития специфической реакции иммунной системы на чужеродные антигены. Т-хелперы усиливают, а Т-супрессоры угнетают иммунный ответ. Поэтому для оценки выраженности иммунного ответа рассчитывают индекс Т-хелперы/Т-супрессоры.

Зрелые В-лимфоциты мигрируют из костного мозга в периферические лимфоидные органы и ткани, где под влиянием антигена (бактерии, вирусы) и при помощи Т-лимфоцитов и макрофагов превращаются в зрелые плазматические клетки. Каждая из них участвует в синтезе иммуноглобулинов (антител), специфичных для данного антигена. При первичном контакте с определенным антигеном синтез иммуноглобулинов начинается через 3 суток, при повторном — к концу 1-х суток. Антитела нейтрализуют токсины, продуцируемые чужеродными клетками.

Часть специфичных для данного антигена В-лимфоцитов сохраняет свою особенность многие годы. Это так называемые клетки памяти. Они могут длительно сохраняться в селезенке, лимфатических узлах, аппендиксе, миндалинах. Однако любой повторный контакт с ранее встреченным антигеном приводит к быстрой активации специфического клона В-лимфоцитов и синтезу необходимых антител (течение 24 часов) для уничтожения чужеродного антигена. На этих особенностях формирования иммунного ответа основана вакцинация против наиболее распространенных инфекционных заболеваний.

Таким образом, основной функцией В-лимфоцитов является продукция антител. Известно 5 классов иммуноглобулинов (Ig; от англ. — Immunoglobulin): IgM, IgG, IgA, IgD и IgE.

Формы иммунного ответа.

Различают следующие формы иммунного ответа на проникновение антигена в организм: биосинтез антител, образование клеток иммунной памяти, реакция гиперчувствительности немедленного типа, реакция гиперчувствительности замедленного типа (в том числе трансплантационный иммунитет), иммунологическая толерантность, идиотип-антиидиотипические отношения.

Различают два варианта выдачи иммунного ответа в форме биосинтеза антител: первичный ответ - после первой встречи организма с данным антигеном, и вторичный ответ - при повторном контакте его с одним и тем же антигеном спустя 2-3 недели. Внешне первичный и вторичный иммунный ответ различаются - по следующим признакам: продолжительность латентного периода, скорость нарастания титра антител, общее количество синтезируемых антител, последовательность синтеза иммуноглобулинов различных классов. Клеточные механизмы первичного и вторичного иммунного ответа также отличаются.

Первичный иммунный ответ. 1) Биосинтез антител начинается не сразу после контакта с антигеном, а после некоторого латентного периода, (индуктивная фаза 6-12 часов) наступает продуктивная фаза выработки антител, продолжающегося 3-5 дней. В течение этого периода происходит процесс распознавания антигена и формирования клеток, которые способны синтезировать антитела к нему; 2) скорость синтеза антител относительно невелика; 3) титры синтезируемых антител не достигают максимальных значений и достигается значительно меньшими дозами антигена; 4) первыми синтезируются антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса IgM, затем — IgG. Позже всех появляются, да и то не во всех случаях, IgA и IgE.

Первичный — при первой встрече с антигеном. Его выраженность достигает максимума к 7-8-му дню, сохраняется в течение 2 недель, а затем снижается. Первыми синтезируются антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса IgM, затем — IgG. Позже всех появляются, да и то не во всех случаях, IgA и IgE.

Вторичный иммунный ответ. 1) Латентный период очень непродолжительный, в пределах нескольких часов; 2) кривая, характеризующая скорость накопления антител, идет значительно круче вверх, чем при первичном ответе, и имеет логарифмический характер; 3) титры антител достигают максимальных значений) синтезируются сразу антитела, относящиеся к классу IgG.

Вторичный – при повторной встрече с антигеном. Вторичный иммунный ответ развивается быстрее и достигает большей (3-4 раза) интенсивности. Синтезируются сразу антитела, относящиеся к классу IgG.

Вторичный иммунный ответ обусловлен формированием клеток иммунной памяти.

Эффективность вторичного ответа зависит: 1) от полного первичного (подготовительного) антигенного стимула; 2) от длительности интервала между первичной и вторичной аппликациями антигена, установлено также, что если дозу вводить два раза с 5-дневным интервалом, эффект ревакцинации усиливается. Передозирование антигена может привести к угнетению вторичного ответа антителами.

Клеточная кооперация в иммунном ответе.

Исходным этапом иммунного ответа, который завершается биосинтезом антител, является поглощение антигена, его процессинг и представление.

Под процессингом антигена понимают переработку антигена в макрофагах в результате которой на его поверхности образуется комплекс молекул антигена (чужого белка) с молекулами своих антигенов тканевой совместимости необходимые для представления другим иммунокомпетентным клеткам.

Дело в том, что в подавляющем большинстве случаев для активации Т-клеток антиген должен быть представлен в виде коротких пептидов, в то время как антитела и В-клетки (рецепторы В-клеток - это тоже антитела) распознают структуру поверхностного детерминанта нативного антигена. Функции процессинга и представления антигена в комплексе с белками МНС класса II выполняют активированные макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки селезенки, а также эпителиальные, эндотелиальные клетки и купферовские клетки печени. Поэтому они и получили название антигенпредставляющих, или А-клеток (вспомогательных клеток, от англ. accessory - вспомогательный).

Основная роль в процессинге и представлении антигена принадлежит макрофагам. В структуре молекулы МНС класса II имеется специальный центр, способный связывать чужеродные антигены. Образование комплекса: белок МНС класса II + антигенный пептид происходит внутри клетки, куда антиген попадает в результате рецепторопосредованного эндоцитоза, и где он подвергается процессингу, а представление процессированного антигена белками МНС класса II - на мембране А-клетки (макрофага).

Кратко схема кооперативного взаимодействия макрофагов, Т - и В-лимфоцитов и выдачи иммунного ответа может быть описана следующим образом.

Патоген поглощается макрофагом.

Макрофаг осуществляет процессинг антигена.

3.Макрофаг с помощью белка МНС класса II представляет процесси-рованный антиген Т-лимфоцитам (хелперам).

4.Т-хелпер узнает представленный антиген с помощью собственного белка МНС класса II и активируется (синтезирует факторы роста, диффе-ренцировки и иные для В-лимфоцитов и других Т-клеток).

5. Антиген распознается и В-лимфоцитом, который также несет про-цессированный антиген и активируется (на его мембране синтезируются рецепторы для различных интерлейкинов: факторов активации, роста, дифференцировки и других).

6. Активированный В-лимфоцит размножается и дифференцируется в антителообразующие клетки и клетки памяти. Клон антителообразующих клеток секретирует антитела в большом количестве.

7. Антитела связываются с антигеном и таким образом маркируют его для узнавания другими компонентами иммунной системы. Антитела сами не разрушают бактерии. Взаимодействуя с ними, они делают их более доступными для фагоцитоза. Выбрасываемые фагоцитами бактериальные антигены связываются антителами, образуются циркулирующие иммунные комплексы, благодаря им антигены выводятся из организма. Разрушение бактерий осуществляется также с помощью системы комплемента. С появлением антител она мобилизуется по классическому пути. Формируется очаг воспаления, происходит активирование других макрофагов. Феномен иммунного прилипания повышает

активность макрофагов. Макрофаги, синтезируя отдельные компоненты системы комплемента, усиливают его активность. Происходит замыкание связи между системами макрофагов и комплемента. Чужеродные антигены, в особенности вирусные, активируют систему интерферонов. В работу включается и главная система гистосовместимости, отвечающий за синтез некоторых компонентов системы комплемента. При участии белков МНС класса I Т-киллерам представляются чужеродные вирусные, бактериальные и другие антигены. Т-киллеры распознают эти комплексы, атакуют и разрушают инфицированные чужеродными агентами клетки.

Таким образом, в формирование иммунного ответа включаются все звенья иммунной системы: системы макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, комплемента, интерферонов и главная система гистосовместимости (гены, позволяющие отличать «свое» (гистосовместимое) от «чужого» (гистонесовместимого); гены, контролируемые иммунный ответ к тимусозависимым антигенам; структурные гены отдельных компонентов системы комплемента).

Для всех форм иммунного ответа требуется согласованное взаимодействие основных факторов иммунной системы: макрофагов, В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, NK-клеток, нулевых клеток (К-клеток), системы комплемента, интерферонов, главной системы гистосовместимости, а также антител. Взаимодействие между ними осуществляется с помощью разнообразных синтезируемых и секретируемых медиаторов. Все иммунокомпетентные клетки несут на своих мембранах уникальные рецепторы, с помощью которых они распознают и воспринимают сигналы от других иммунных клеток, перестраивают свой метаболизм, синтезируют или устраняют свои собственные рецепторы. Благодаря прямой и обратной связи между различными субпопуляциями клеток иммунной системы, осуществляемой как путем прямого контакта, так и через различные факторы активации, пролиферации, дифференциации и презентации (представления), обеспечивается устойчивый механизм саморегуляции всей иммунной системы. Медиаторы, вырабатываемые клетками иммунной системы и участвующие в регуляции ее активности, получили общее название цитокинов (от греч. *kytos* - клетка и *kineo* - приводить в движение). Их подразделяют на монокины - медиаторы, продуцируемые

моноцитами и макрофагами, и лимфокины - медиаторы, секретируемые активированными лимфоцитами. Лимфокины представляют собой белки и пептиды, не относящиеся к иммуноглобулинам. Для тех лимфокинов, которые химически идентифицированы и получены в чистом виде, в 1979 г. было предложено название интерлейкинов, они обозначаются номерами - IL - 1—20.

Интерлейкины - семейство биологически активных гормоноподобных белковых молекул, различных по структуре и функциям, которые участвуют в регуляции иммунитета и воспалительных процессов. В отличие от антител их структура не определяется структурой антигена, индуцирующего их синтез и секрецию. Синтез интерлейкинов побуждается действием не только антигенов, но и других факторов, в том числе и самих интерлейкинов. Они синтезируются при различных иммунных ответах, инфекционных процессах, повреждении тканей.

Все интерлейкины полифункциональны, а их действие опосредуется различными клеточными поверхностными рецепторами. Наиболее полно изучены следующие интерлейкины.

Интерлейкин-1 (IL-1). Синтезируется макрофагами, моноцитами, дендритными, эндотелиальными и эпителиальными клетками, NK-клетками, фибробластами, астроцитами. IL-1 является фактором активации лимфоцитов, кофактором роста и созревания Т- и В-лимфоцитов. Активирует Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, вызывает хемотаксис макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов, обладает пирогенным действием.

Интерлейкин-2 (IL-2). Синтезируется только активированными Т-клетками, стимулирует рост и созревание активированных Т-клеток и образование ими лимфокинов; стимулирует активность Т-цитотоксических клеток, NK-клеток, моноцитов. Является кофактором пролиферации В-лимфоцитов, стимулирует их созревание и защищает клетки от апоптоза.

Образование иммунной памяти.

Иммунная память - одна из форм иммунного ответа. Она означает способность организма человека или животного реагировать на повторное введение того антигена, которым он был иммунизирован ранее, быстрее и с большей силой. Иммунная память проявляется как в отношении выработки антител, так и в отношении других иммунных реакций (гиперчувствительность

замедленного типа, трансплантационный иммунитет и пр.), и может сохраняться длительное время.

Носителями иммунной памяти становятся Т - и В-лимфоциты после взаимодействия с соответствующим антигеном, или так называемые антиген-стимулированные лимфоциты. Клетки памяти представляют собой ту часть Т - и В - антигенстимулированных лимфоцитов, которые после 2-3 делений переходят в покоящееся состояние и длительное время рециркулируют в организме. Таким образом, они служат своеобразным резервом иммунокомпетентных клеток, способных при повторной встрече с соответствующим антигеном быстро превращаться в клетки-эффекторы иммунного ответа. В-лимфоциты в этом случае быстро трансформируются в антителообразующие клетки, и выработка антител происходит по вторичному типу. В свою очередь антигенстимулированные Т-лимфоциты, циркулируя в организме, готовы в любой момент распознать антиген, который их сенсибилизировал, и немедленно включиться в иммунный ответ.

Следовательно, возникновение и поддержание популяции клеток иммунной памяти - одно из главных условий длительного сохранения приобретенного иммунитета. Состояние иммунной памяти обусловлено не столько присутствием долгоживущих клеток памяти, сколько постоянной стимуляцией их образования антигенами, которые длительно сохраняются в организме. Антигены могут долгое время сохраняться на поверхности фолликулярных дендритных клеток и в различных других клетках вне лимфоидной системы, постоянно воздействуя на иммунокомпетентные клетки.

Гиперчувствительность немедленного типа (ГЧН).

К реакциям повышенной чувствительности немедленного типа относятся: сывороточная анафилаксия, лекарственная анафилаксия, сывороточная болезнь, сенная лихорадка, бронхиальная астма, крапивница и другие аллергические реакции, в том числе к таким аллергенам, как пыльца некоторых растений, красители, шерсть и т. п. В их основе лежат общие механизмы, которые лучше всего изучены при анафилаксии.

Реакции анафилаксии, как и другие реакции гиперчувствительности немедленного типа, являются иммунологически специфичными и проявляются в отношении того антигена, к которому организм сенсибилизирован. Для

возникновения состояния сенсибилизации достаточно введения очень малых доз антигена (аллергена). В частности, первичная сенсибилизирующая доза лошадиной сыворотки для морской свинки составляет 0,000001 мл. Состояние повышенной чувствительности развивается через 7-14 дней после введения антигена и сохраняется месяцами и годами.

Реакция анафилаксии характеризуется следующими особенностями: иммунологической специфичностью, немедленностью проявления (анафилактический шок развивается через несколько минут после введения разрешающей дозы) и опосредованностью антителами. Доказательством ведущей роли антител в реакциях гиперчувствительности немедленного типа (ГЧН) является возможность переноса состояния повышенной чувствительности от сенсибилизированного донора с помощью его сыворотки или чистой фракции антител несенсибилизированному реципиенту. Такой пассивный перенос анафилаксии с помощью антител приводит к развитию у реципиента состояния повышенной чувствительности, которая может быть выявлена введением ему разрешающей дозы антигена.

В развитии анафилаксии можно выделить следующие три стадии: 1) иммунологическую, 2) патохимическую и 3) патофизиологическую. *Иммунологическая стадия*, которая определяет специфичность анафилаксии, характеризуется взаимодействием антигена с антителом, фиксированным на клетках сенсибилизированного организма. Для *патохимической стадии* характерна активация протеолитических ферментов, в результате действия которых из клеток высвобождаются биологически активные вещества. В настоящее время известно более 30 таких веществ, участвующих в механизме развития анафилаксии, однако основная роль принадлежит гистамину, серотонину, брадикинину и лейкотриенам. Лейкотриены А, В, С, D, Е - продукты липоксигеназного превращения арахидоновой кислоты -освобождаются тучными клетками, базофилами и тромбоцитами. *Патофизиологическая стадия* развивается в результате действия биологически активных веществ на различные системы органов, в особенности на гладкую мускулатуру. Наблюдающееся в результате такого воздействия сокращение гладких мышц определяет клиническую картину анафилактического шока у животных. В частности у лошадей, крупного рогатого скота и

морских свинок поражается гладкая мускулатура бронхов, что ведет к развитию бронхиального спазма и нарушения дыхания. У собак наблюдается рвота, диарея и спазм гладкой мускулатуры кишечника, у кроликов - спазм легочных артерий, у человека страдает сердечно-сосудистая система. К наиболее характерным симптомам анафилактического шока относятся: гипотония, учащение мочеиспускания и дефекации, отек, лейкопения, тромбоцитопения, снижение титра комплемента, понижение свертываемости крови и температуры тела.

Феномен Артюса. Анафилаксия развивается в том случае, когда в организме, помимо антител класса IgE, присутствует незначительное количество антител других классов. Ее развитие можно предотвратить, увеличивая количество антител с помощью пассивной иммунизации, как это делают при лечении больных астмой людей.

Сывороточная болезнь. Явление гиперчувствительности, близкое к феномену Артюса, возникает после введения большой дозы терапевтической антисыворотки, полученной от других видов, но встречается только с сильной реакцией на чужеродные сывороточные белки, при которой образуется большое количество антител. При этом, как предполагается, происходит следующее. В первый период после введения сыворотки, который длится несколько дней, концентрация белков сыворотки равномерно уменьшается вследствие разрушения в ходе метаболизма и выделения. Затем следует период значительно более быстрого исчезновения сывороточных белков, продолжающегося до тех пор, пока еще возможно их определение. К этому времени относится появление первых антител.

Реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЧЗ). Этот тип гиперчувствительности возникает при многих инфекционных болезнях, например: при туберкулезе, бруцеллезе, дизентерии, токсоплазмозе, некоторых гельминтозах, микозах и т. д., и выявляется с помощью соответствующих кожных реакций, которые служат специфическими диагностическими пробами. Состояние гиперчувствительности замедленного типа могут индуцировать различные лекарственные препараты, красители, антисептики и другие аллергены. К аллергенам органической и неорганической природы, имеющим низкую молекулярную массу, но обладающим способностью соединяться с белками кожи и

слизистых оболочек (т. е. являющимися гаптенами), нередко возникает так называемая контактная аллергия. Сенсибилизация формируется в результате длительного контакта с такими веществами и проявляется в местных изменениях на коже и слизистых оболочках. Наиболее типичным примером повышенной чувствительности замедленного типа является аллергическая реакция кожи больных туберкулезом людей и животных на туберкулин. К реакциям гиперчувствительности замедленного типа относится также трансплантационный иммунитет.

Основные особенности гиперчувствительности замедленного типа. Гиперчувствительность замедленная (ГЧЗ), как и повышенная чувствительность немедленного типа, индуцируется веществами антигенной природы и отличается высокой иммунной специфичностью, т. е. она проявляется только в отношении того антигена, который индуцировал ее развитие. В связи с этим кожные аллергические пробы, выявляющие эти состояния, имеют большое диагностическое значение. Основные отличия гиперчувствительности замедленного типа от повышенной чувствительности немедленного типа следующие.

Во-первых, местные и общие реакции, выявляющие гиперчувствительность замедленного типа, развиваются спустя значительно больший срок после введения антигена, чем в случае гиперчувствительности немедленного типа. В частности, кожные реакции в этом случае появляются через 6-8 ч и достигают максимального развития через 1-2 суток. Интенсивность ГЧЗ определяют по диаметру уплотненного участка ткани на поверхности кожи, лишенной волос. Таким образом, для реакции повышенной чувствительности замедленного типа характерно отсутствие эффекта немедленности.

Во-вторых, гистологическая картина местных проявлений гиперчувствительности замедленного действия отличается от таковой при повышенной чувствительности немедленного типа тем, что в очаге реакции преобладают лимфоциты и моноциты. В развитии кожной реакции, выявляющей гиперчувствительность немедленного типа, преобладающую роль играют полиморфноядерные лейкоциты.

В-третьих, гиперчувствительность замедленного типа не может быть передана пассивно от сенсибилизированного организма с помощью его сыворотки интактному (несенсибилизированному)

организму, т. е. этот тип повышенной чувствительности не связан с антителами.

Главное отличие реакций гиперчувствительности замедленного типа от реакций гиперчувствительности немедленного типа заключается в том, что они опосредуются не антителами, а сенсибилизированными клетками - Т-лимфоцитами, т. е. лимфоцитами, которые прошли иммунологическое «обучение» в тимусе. Т-лимфоциты несут на своей поверхности различные специфические рецепторы, с помощью которых распознают самые различные чужеродные вещества, в том числе трансплантационные антигены, и способны с ними взаимодействовать. Все типы реакций гиперчувствительности замедленного действия характеризуются общностью иммунных механизмов, в которых главными действующими агентами являются лимфоциты и продуцируемые ими гуморальные факторы. Реализация этих реакций лимфоцитами подтверждается многими феноменами, среди которых в первую очередь можно выделить следующие три.

1. Состояние повышенной чувствительности замедленного типа можно передать от донора другому организму, но только путем введения последнему от сенсибилизированного организма его лимфоцитов, а не антител. В отличие от пассивного, такой тип иммунного состояния, передаваемого не сывороткой, а лимфоцитами, получил название адоптивного (от англ. adopt - присваивать), т. е. присвоенного. Например, если от сенсибилизированного туберкулином животного передать внутривенно или внутрибрюшинно лимфоидные клетки здоровому животному, то оно будет отвечать на введение туберкулина положительными кожными реакциями гиперчувствительности замедленного типа.

2. Реакции гиперчувствительности замедленного типа можно подавить или ослабить, если перед введением разрешающей дозы аллергена ввести ан-тилимфоцитарную сыворотку.

3. С реакцией ГЧЗ хорошо коррелирует способность сенсибилизированных Т-лимфоцитов синтезировать различные медиаторы - лимфокины, в том числе фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (ФИМ). Он образуется при стимуляции сенсибилизированных Т-лимфоцитов *in vitro* соответствующим антигеном.

Иммунологическая толерантность.

Под иммунологической толерантностью (отсутствием иммунного ответа) понимают специфическое подавление иммунного ответа, вызванное предварительным введением антигена. Толерантность может проявляться в подавлении специфического иммунного ответа, включающего и синтез антител на соответствующий антиген, и гиперчувствительность замедленного типа, или же избирательно влияет на синтез антител того или иного класса иммуноглобулинов либо на тип иммунного ответа.

Толерантность (от англ. tolerance – терпимость) может быть полной (образования антител не происходит) либо частичной (существенное снижение иммунного ответа).

Изучение механизма иммунологической толерантности стало особенно интенсивным после того, как в 1945 г. Р. Оуэн обнаружил, что у дизиготных, т. е. генетически отличающихся телят-двоен после рождения и на протяжении последующей жизни в крови циркулируют эритроциты обоих организмов, а кожный трансплантат, пересаженный от одного из них другому, стойко приживается.

Для иммунологической толерантности, как одной из форм иммунного ответа, характерны следующие особенности.

Во-первых, развитие этого состояния индуцируется только веществами антигенной природы. Во-вторых, толерантность антиген-специфична. Она проявляется только в отношении того антигена, который индуцировал ее формирование. В-третьих, искусственно полученная толерантность проявляется в разной степени, и продолжительность ее сохранения сильно варьирует. Это зависит от периода жизни, во время которого индуцируется развитие толерантности, от характера, используемого для этой цели антигена, его дозы, физических свойств и способа введения, а также от физиологического состояния организма.

Эффективнее всего развитие толерантности удается индуцировать в эмбриональном периоде, хотя ее можно вызвать и у взрослых животных. Однако чем позднее, тем это состояние индуцируется труднее и большей дозы антигена требует. Чем больше доза антигена, тем выше степень толерантности и тем дольше она сохраняется.

Сокращения:

АГ – антиген
Th – Т-хелперные клетки
ИЛ – интерлейкины
Р – плазматические клетки
ИНФ – интерферон
АПК – антиген-презентирующая клетка
ФНО – фактор некроза опухолей
МНС – белки главного комплекса гистосовместимости

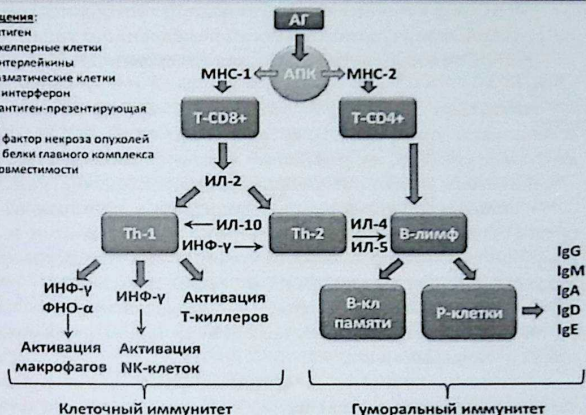


Рис.31. Упрощенная схема иммунного ответа. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Контрольные вопросы

1. Каковы гуморальные факторы иммунитета?
2. Каковы клеточные факторы иммунитета?
3. Что такое первичный иммунный ответ?
4. Что такое вторичный иммунный ответ?
5. Что такое клеточная кооперация в иммунном ответе?
6. Опишите схему кооперативного взаимодействия макрофагов,

Т- и В-

лимфоцитов.

7. Что такое интерлейкины?
8. Как образуется иммунная память?
9. Что такое гиперчувствительность немедленного типа?
10. Что такое анафилаксия?
11. Что такое феномен Артюса?
12. Как проходит сывороточная болезнь?
13. Что такое реакция гиперчувствительность замедленного типа?

14. В чем отличие гиперчувствительности замедленного типа от реакций гиперчувствительности немедленного типа?

15. Что такое иммунологическая толерантность?

Антигены — это полимеры органической природы, генетически чужеродные для макроорганизма, вызывающие в нем иммунные реакции, направленные на его устранение.

Антигены имеют разнообразное происхождение. Различают:

- *экзогенные антигены* — попадают в организм из внешней среды. Они разделяются на природные (образуются в процессе природного биологического синтеза) и синтетические (получены искусственно направленным химическим синтезом),

- *эндогенные антигены* — появляются в собственном организме при структурных изменениях нормальных молекул или при генетической мутации.

Антигены попадают в организм различными путями: через кожные покровы и слизистые оболочки, непосредственно во внутреннюю среду, минуя покровы или образовываясь внутри организма. Они распознаются иммунокомпетентными клетками и вызывают разнообразные иммунологические реакции, направленные на их инактивацию, разрушение и удаление. Характерными свойствами антигенов являются:

- *Антигенность,*
- *Специфичность,*
- *Иммуногенность.*

Антигенность - способность антигена взаимодействовать с факторами иммунной системы, а именно с антителами.

Специфичность — способность антигена избирательно реагировать со строго определенными антителами или клонами лимфоцитов. При этом взаимодействие происходит не со всей молекулой антигена, а только с ее небольшим участком, который называется *антигенная детерминанта*. Молекулы антигенов имеют большие размеры, в их структуре определяется множество антигенных детерминант, которые распознаются разными по специфичности антителами.

Иммуногенность - способность антигена вызывать иммунный ответ организма, иммунную защиту организма. Иммуногенность относится только к микробным антигенам. Степень

иммуногенности зависит от ряда факторов со стороны самого антигена:

1. *Чужеродность антигена* - отличие структуры антигена от молекул организма. Чем более чужеродным является антиген для организма, тем более сильный иммунный ответ он вызывает, т.е. обладает более выраженной иммуногенностью.

2. *Природа антигена* - значительно влияет на его иммуногенность. Выраженными иммуногенными свойствами обладают белки, тогда, как чистые полисахариды, нуклеиновые кислоты и липиды менее иммуногенны. Однако, липополисахариды, гликопротеины, липопротеины способны достаточно активировать иммунную систему.

3. *Молекулярная масса антигена*. Так, небольшие полипептидные молекулы с массой менее 5000 D, как правило, менее иммуногенны, в то же время полисахарид с массой 600 000D вызывает достаточно сильную иммунную реакцию

4. *Структура антигена* - более выраженной иммуногенностью обладают глобулярные формы молекул, чем фибриллярные (нитевидные).

5. *Растворимость антигена* - если вещество нерастворимо и не может

быть получено в виде коллоидного раствора, оно не является антигеном. Также на силу иммунного ответа влияет динамика поступления антигена в организм, способ его введения и количество.

По антигенности различают:

- Полноценные антигены,
- Неполноценные антигены (гаптены).

Полноценные антигены обладают выраженной антигенностью и иммуногенностью. Они представляют собой вещества с большой молекулярной массой (более 10 000 D), обычно белковой природы, формой молекулы в виде глобулы.

Неполноценные антигены не обладают иммуногенностью, то есть не способны при введении в организм вызывать иммунный ответ. Однако они обладают антигенностью, что позволяет им специфически взаимодействовать с антителами. Гаптены имеют небольшую молекулярную массу (ниже 10000 D). Гаптены могут становиться полноценными антигенами, если с белковой молекулой.

Иммуногенностью можно управлять; для повышения иммуногенности антигена применяются вещества – *адьюванты*.

Антигены микробов.

Антигены бактериальной клетки. В структуре бактериальной клетки различают три вида антигенов: *соматический* (О-антиген), *жгутиковый* (Н-антиген), *капсульный* (К-антиген).

Соматический антиген (О-антиген) входит в состав клеточной стенки бактерий, является липополисахаридом, термостабилен, обладает свойствами эндотоксина.

Жгутиковый антиген (Н-антиген) локализован в жгутиках, состоит из белка флагеллина, термолабилен.

Капсульный антиген (К-антиген) располагается на поверхности клеточной стенки, встречается у бактерий, образующих капсулу. Вариантом капсульного антигена является *Vi-антиген* (антиген вирулентности). Обнаруживается у некоторых энтеробактерий, обладающих высокой вирулентностью.

Антигенными свойствами обладают также белковые токсины, ферменты, выделяемые бактериями в окружающую среду.

Антигенное строение бактерий – важный критерий их классификации и дифференциации. Каждый вид обладает *видоспецифическими* и *группоспецифическими* антигенами, общими для всего рода и более высокого таксономического ранга. Кроме того, внутри одного вида бактерии существуют различные антигенные (серологические) варианты – *серовары*, или *серотипы*. Серовары некоторых возбудителей могут существенно отличаться друг от друга, что следует учитывать как при диагностике болезни, так и при специфической профилактике и терапии. Решение этих задач требует знания отдельных антигенных свойств не только компонентов бактериальной клетки, но и продуктов жизнедеятельности возбудителя (экзотоксинов, агрессивных и т.д.). Структуру и свойства антигенов можно рассмотреть на примере следующих возбудителей.

Примеры антигенного строения бактерий

Сальмонеллы. По схеме Кауфмана-Уайта, представители рода сальмонелл насчитывают около 2200 сероваров. Они имеют соматический О-антигенов и жгутиковый Н-антиген. Кроме того

есть оболочечный (капсульный, поверхностный антиген) К-антиген.

Эшерихий. Имеют антигены трех видов: О, Н, К. Описано 157 типов соматических «О»-антигенов, 97 - капсульных «К»- и 50 жгутиковых «Н»-антигенов. «О»-антиген локализован в цитоплазме и мембране бактериальной клетки, представляет собой липополисахариднопротеиновый комплекс (антиген Буовена), выдерживает кипячение или автоклавирование при 120°C в течение 2,5 ч. С ним связана токсичность микробов (эндотоксин). К-антигены кишечной палочки существуют в трех вариантах, обозначаемых L, А, В. Первый имеет белковую природу, термолабилен, разрушается при нагревании до 60°C. В-антиген тоже термолабилен, при кипячении иммуногенность утрачивает, но сохраняет агглютинобельность. А-антиген термостабильный, представлен кислыми полисахаридами. Штаммы *E.coli*, имеющие К-антигены, наиболее вирулентны.

Серотипирование *E.coli* имеет большое диагностическое значение и осуществляется при помощи типоспецифических агглютинирующих сывороток. При колибактериозе отдельных видов животных этиологическую роль играют определенные серовары: у телят – 078,06, 0119 и др., поросят – 08,0138, 041 и др., у птиц – 02, 09 и др.

В последнее время большое значение придается адгезинам, которые «прикрепляют» микроб к эпителию кишечника. Адгезины являются компонентом поверхностных структур бактерий и часто содержатся в специальных нитевидных выростах (ресничках) бактериальной клетки, называемых фибриями. Фибрии отличаются от жгутиков, но идентичны с ними.

Стрептококки. Р.Ленсфильд (1933) выделила из стрептококков четыре антигенных компонента – М-, С-, Т- и R-вещество. М-антиген представляет белок, растворимый в кислоте и спирте, термостабильный, легко гидролизуетс протеолитическими ферментами. Антиген обладает высокоиммуногенным свойством. С-антиген является полисахаридом, состоит из остатков рамнозы и глюкозамина. Т-антиген имеет белковую природу, не растворяется в спирте, устойчив к действию протеолитических ферментов. R-антиген менее изучен, по структуре близок к Т-веществу. В клетке

микроба могут содержаться описанные антигены как в отдельности, так и вместе. По антигенной структуре различают 17 серологических групп стрептококков, которые обозначаются А, В, С, и т.д. представители группы А патогенны для человека, вызывает ангину, скарлатину, сепсис. Группы В, С и Д включают возбудителей болезней животных.

Стафилококки в патологии человека и животных играют значительную роль. Стафилококковые инфекции стали важной проблемой в медицине и ветеринарии. Из 13 описанных видов стафилококков патогенными признаны 9. Клеточная стенка стафилококков состоит главным образом из пептидогликана и тейхоевой кислоты. Обе эти субстанции обладают выраженными антигенными свойствами.

Возбудитель сибирской язвы. Из клеток возбудителя выделено два основных антигенных компонента: соматический полисахарид (С-антиген) и капсульный полипептид (Р-антиген).

Оба указанных антигена – постоянные компоненты возбудителя сибирской язвы – не обладают иммуногенными свойствами.

Пастереллы. Имеет капсульный К-антиген, состоящий из белка и полисахаридов, и О-антиген, представляющий собой эндотоксин липополисахаридно-белковый природы. По К-антигену различают четыре серологических варианта: А, В, Д, Е. Серовар А – патогенен для птиц, В и Е – для крупного рогатого скота, Д – для всех видов млекопитающих.

Под антигенной специфичностью понимают антигенные особенности, отличающие антигены друг от друга и обуславливающие специфичность иммунологических реакций при поступлении их в организм.

Различают гетерогенную, видовую, групповую специфичность антигенов.

Гетероспецифичность антигенов обусловлена общими для представителей разных видов антигенными комплексами или чаще общими антигенными детерминантами на различающихся по другим признакам комплексах.

Видовая специфичность антигенов обеспечивает отличия и защиту представителей одного вида от особей другого вида.

Групповая специфичность антигенов обуславливает различия среди групп особей одного вида организмов.

Антигенные свойства присущи также микробным *токсинам, ферментам* и другим бактериальным белкам. Экзотоксины рассматриваются как внеклеточные антигены.

У бактерий выделяют еще так называемые *протективные антигены*. Впервые они были найдены в экссудатах животных больных сибирской язвой. Их можно получить при культивировании сибирезвездных бацилл на животных тканях и специальных питательных средах, состоящих из аминокислот. Протективные антигены обладают весьма высокими предохраняющими свойствами и могут быть использованы в практике иммунизации против некоторых инфекционных болезней, в частности против сибирской язвы и чумы. Подобные антигены найдены у возбудителей бруцеллеза, туляремии и у других микроорганизмов. Наконец, у бактерий выявлены также *антигены, общие с антигенами тканей млекопитающих*, так называемые *перекрестно реагирующие антигены*. Например, установлено наличие общих антигенов у эритроцитов человека, стафилококков, стрептококков, бактерий чумы, кишечной палочки, некоторых сальмонелл, шигелл, вирусов оспы, гриппа и других возбудителей инфекционных болезней. Если имеется сходство антигенной структуры хозяина и возбудителя, макроорганизм не способен вырабатывать иммунитет, и болезнь протекает более тяжело. Возможно, в отдельных случаях длительное носительство возбудителя и неэффективность вакцинации являются следствием общности антигенов микроба с антигенами тканей животных.

У некоторых бактерий обнаружены так называемые *суперантигены*. Ими являются, например, стафилококковые экзотоксины: энтеротоксины и токсин, вызывающий синдром токсического шока. Свое название суперантигенов такие белки получили потому, что они, связываясь отличным от других антигенов способом с рецепторами Т-лимфоцитов, активируют их. Т-лимфоциты (Т-хелперы) начинают быстро размножаться и секретировать избыточное количество интерлейкина-2, который и вызывает отравление. В свою очередь избыточное количество Т-лимфоцитов может привести к различным заболеваниям и подавлению самой иммунной системы.

Антитела играют решающую роль в развитии иммунитета при многих инфекциях, при которых уровень циркулирующих антител является показателем защиты.

Основной функцией антител является специфическое связывание антигена. Существует несколько групп антител, различающихся по характеру действия в механизмах антиинфекционного иммунитета:

- антитела, нейтрализующие бактериальные токсины;
- вируснейтрализующие антитела, препятствующие прикреплению вируса к клетке;
- антитела, оказывающие цитотоксическое действие на вируссодержащие клетки в присутствии комплемента;
- антитела, вызывающие гибель (лизис) микроба с участием комплемента;
- антитела, опсонизирующие возбудителя и подавляющие его ферментную систему;
- антитела, опсонизирующие макрофаги и усиливающие фагоцитоз;
- антитела, образующие с растворимым антигеном комплекс, который вызывает повышение проницаемости сосудов и появление признаков острого воспаления;
- антитела, усиливающие цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов по отношению к гельминтам.

Антитела - специфические белки, иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться и отличающиеся от обычных глобулинов наличием активного центра.

В соответствии с международной классификацией, совокупность сывороточных белков, обладающих свойствами антител, называют иммуноглобулинами и обозначают символом Ig.

Антитела делятся на группы:

- *первая* - небольшие молекулы с константой седиментации 7S (а-глобулины);
- *вторая* - большие молекулы с константой седиментации 19 S (а - глобулины).

Молекула антитела включает четыре полипептидные цепи, состоящие из аминокислот. Две из них тяжелые (м.м. 70000

дальтон) и две легкие (м.м. 20000 дальтон). Легкие и тяжелые цепи связаны между собой дисульфидными мостиками. Легкие цепи являются общими для всех классов и подклассов. Тяжелые цепи имеют характерные особенности строения у каждого класса иммуноглобулинов. В молекуле антитела имеются активные центры, располагающиеся на концах полипептидных цепей и специфически реагирующие с антигеном. Неполные антитела одновалентны (антидетерминанта одна), полные имеют две, реже более антидетерминанты.

Выработка антител:

- Против возбудителей на поверхности эпителия вырабатываются IgA антитела
- Против микроорганизмов, проникших в ткани или кровь вырабатываются IgG антитела четырех подклассов (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)
- Против паразитов вырабатываются IgE антитела
- Продуцентами антител являются В-лимфоциты в очаге инфекции, региональной лимфоидной ткани, лимфоузлах и селезенке.

Классы иммуноглобулинов

Иммуноглобулин Ig M

Молодой В-лимфоцит, только что включившийся в иммунный ответ, вначале вырабатывает IgM антитела, а затем переключается на IgA, IgG или IgE

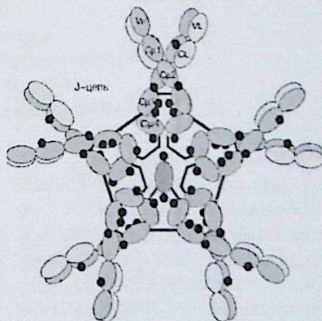
Присутствие IgM антител говорит об острой или обострившейся инфекции 5 активных центров;

Первыми синтезируются IgM (выявляются через 2-3 суток); Составляют 5-10% глобулинов крови;

Не проходят через планцету;

Период жизни 5 суток;

Активизируют комплемент



Иммуноглобулин А

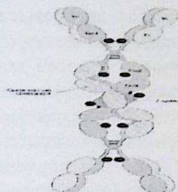
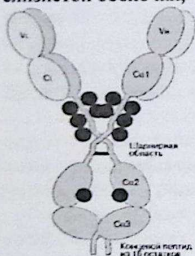
Против возбудителей на поверхности эпителия

вырабатываются IgA антитела

Встречается два вида IgA:

- сывороточный и секреторный;

Секреторный sIgA - 10-15% образуется В- лимфоцитами слизистой оболочки;



Сывороточный IgA составляет 15-20% всех глобулинов крови;

Продолжительность жизни 6 дней;

Встречается во всех жидкостях организма.

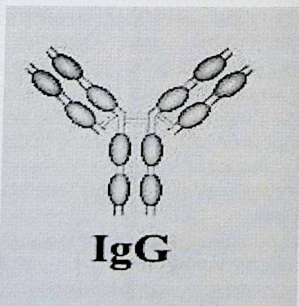
IgA препятствует адгезии и проникновению бактерий, вирусов и токсинов в подслизистую и систему кровообращения.

Связанные с IgA микробы, вирусы и токсины затем удаляются за счет механического клиренса. IgA реакция на инфекцию не сопровождается болезнью.

Иммуноглобулин IgG

IgG антитела связываются с вирусами, микробами и токсинами в глубине тканей или в циркуляторном русле крови. Они активируют систему лизирующих ферментов (комплемент) и фагоциты (нейтрофилы), таким образом, уничтожая вирусов, бактерии и их токсинов

-IgG ответ сопровождается болезнью



-IgG антитела имеет 2
активных центра;

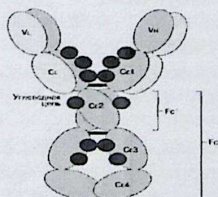
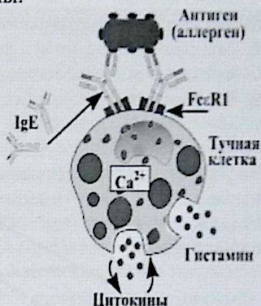
Пик синтеза IgG 10-14 сутки и могут сохраняться в низком титре в течение всей жизни; 90% глобулинов крови; Проходят через плаценту; Период жизни 23 дня.

Иммуноглобулин E

IgE антитела связываются с базофилами и тучными клетками. При встрече с паразитом они вызывают выброс гистамина и других биологически активных веществ из этих клеток. Гистамин привлекает эозинофилы, которые оказывают повреждающее действие на паразитов.

При нарушенном иммунном ответе IgE может вырабатываться против непаразитарных антигенов, что приводит к аллергиям.

- Участвует в запуске анафилактических реакций
- Составляет 0,002% глобулинов крови
- Помогает прохождению Ig A через слизистую
- Период жизни 3 суток.



Иммуноглобулин D

Обладает комплемент фиксирующей активностью
Рецептор В-клеток
0,2-1% глобулинов крови
Период жизни 3 суток

Рис.32. Иммуноглобулины M, A, G, E, D. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Контрольные вопросы:

1. Антигенное строение бактерий.
2. Антигенное строение сальмонелл, пастерелл
3. Антигенное строение эшерихии, стрептококков
4. Какие виды антигенов Вы знаете?
5. Что такое протективные антигены
6. Что такое перекрестно реагирующие антигены?
7. Что такое видовая специфичность антигенов?
8. Что такое групповая специфичность антигенов?

14. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний. Практическое использование феномена иммунитета. Вакцины. Сыворотки крови. Аллергены. Диагностикумы.

Иммунопрофилактика — метод индивидуальной или массовой защиты человека и животного от заболеваний путём создания или усиления искусственного иммунитета.

Иммунотерапия — метод лечения инфекционных заболеваний путём создания или усиления искусственного иммунитета.

Для профилактики и лечения инфекционных болезней большое значение имеет создание профилактических, диагностических и лечебных препаратов, объединяемых в группу **иммунобиологических препаратов**.

В нашей стране существует система Государственного контроля за качеством иммунобиологических препаратов, изготавливаемых на предприятиях биологической промышленности, а также поступающих из-за рубежа.

В задачу государственных контролеров, работающих на предприятиях и подчиняющихся отделу ветеринарии МСХ РК входит:

- контроль качества сырья и материалов, используемых для производства биопрепаратов, в соответствии с требованиями нормативно-технической документации;
- контроль технологии изготовления биопрепаратов в соответствии с регламентом их производства;
- контроль готовой продукции в соответствии с требованиями стандарта.

Только после оценки по комплексу показателей вакцина решением государственных органов принимается для использования в практике. На каждую ампулу, флакон наклеивается этикетка с надписью с указанием названия препарата, его объема, срока годности, номера серии, контрольного номера. В каждую коробку обязательно вкладывается инструкция по применению препарата.

Методы введения вакцин в зависимости от особенностей микроорганизмов, из которых они получены, могут быть различными: внутрикожно, подкожно, внутримышечно, интраназально, перорально (энтерально), через слизистые оболочки дыхательных путей с использованием искусственных аэрозолей живых или убитых вакцин.

Биологической промышленностью для ветеринарной практики выпускается более 150 различных биопрепаратов. В соответствии с целевым назначением и принципам изготовления их подразделяют на следующие группы:

- вакцины;
- лечебно-профилактические иммунные сыворотки;
- диагностические иммунные сыворотки;
- бактериофаги.

Биопрепараты для промышленных целей производят на специализированных предприятиях – биокомбинаты или биофабрики, научно-производственные лаборатории.

Контроль над производством биопрепаратов, разработкой стандартов и технических условий, содержащие сведения о ветеринарных препаратах, регистрация (перерегистрация) осуществляется специальным органом, называемый государственным реестром ветеринарных препаратов МСХ РК.

Больше всего вырабатывают препаратов, предназначенных для создания активного иммунитета – вакцин. Вакцины бывают живые ослабленные (аттенуированные), убитые (инактивированные), корпускулярные (из цельных микробных клеток), химические (из антигенных фракций).

Вакцины живые – препараты, приготовленные из живых ослабленных (аттенуированных) штаммов микробов, способных размножаться в организме животного и создавать иммунитет, не вызывая клинически выраженного заболевания.

Живые вакцины представляют собой взвеси выращенных на различных питательных средах, вакцинных штаммов микроорганизмов. Вакцинные штаммы микробов обладают пониженной патогенностью (вирулентностью) и выраженной иммуногенностью, т.е. способностью индуцировать поствакцинальный иммунитет различной направленностью, степени напряженности и длительности.

Вакцинные штаммы микроорганизмов получают путем отбора клонов, наследственно утративших патогенность, но сохранивших иммуногенность, из числа выделяемых от животных или путем искусственного ослабления (аттенуации) патогенных свойств и вирулентности патогенных возбудителей (воздействие физических, химических и биологических факторов). Живые вакцины, введенные в организм, начинают размножаться вначале на месте введения, а затем в регионарных к этому месту лимфатических узлах и внутренних органах, вызывают бессимптомную (латентную) инфекцию, аналогичную очень часто наблюдаемой в естественных условиях. Развивающийся вакцинный процесс протекает в течение нескольких недель, что способствует выраженному антигенному раздражению иммунной системы и в вакцинальный процесс вовлекаются иммунокомпетентные клетки, отражающие эволюционно сложившиеся механизмы защиты организма и в результате формированию более напряженного и длительного иммунитета, чем при многократном применении убитых вакцин. В качестве вакцинных штаммов чаще используют аутокотрофные, рибосомные мутанты, а также гибридные штаммы. Штаммы должны иметь генетические маркеры, отличающие их от вирулентных прототипов.

Следующим недостатком живых вакцин является необходимость соблюдения строгих мер, предохраняющих микроорганизмы от отмирания (соблюдение определенного температурного режима хранения и др.). В связи с этим в настоящее время большинство живых вакцин выпускают в сухом лиофилизированном состоянии, что удлиняет сроки их пригодности.

Живые вакцины очень чувствительны к дезинфицирующим растворам, высокой температуре. Поэтому при применении препаратов важно не допустить их контакта с дезинфицирующими растворами, а также воздержаться от приема антибиотиков (за 1-2

дня до и 7 дней после вакцинации). Живые вирусные вакцины можно применять одновременно с антибиотиками, поскольку на воспроизводство вирусов эти препараты не влияют.

Вакцины концентрированные – препараты, содержащие антиген в концентрированном виде.

Вакцины культуральные – препараты, для изготовления которых используется вирус, размноженный в культурах тканей.

Вакцины лапинизированные – препараты, для изготовления которых используется вирус, размноженный в организме кроликов.

Вакцины политиповые – (поливариантные, полиштаммовые) – препараты, содержащие антигены различных серологических типов, вариантов, штаммов возбудителей данной болезни.

Вакцины сухие – препараты, высушенные в условиях глубокого вакуума после предварительного замораживания (лиофильная сушка).

Вакцины тканевые – препараты из различных тканей (кровь, лимфоузлы и т.п.) животных, организм которых был использован в качестве среды размножения возбудителя.

Вакцины убитые (инактивированные) – препараты из культур микроорганизмов, убитых нагреванием, формалином, фенолом, спиртом, ацетоном и т.д.

Убитые (инактивированные) вакцины представляют собой препараты, приготовленные из штаммов бактерий и вирусов, убитых либо мягким нагреванием, либо химическими веществами (формалин, спирт, ацетон и др.)

Инактивированные (убитые вакцины) – это иммунопрепараты, в которых содержатся микроорганизмы, обработанные таким образом, что они потеряли способность к размножению в организме привитых животных. Проблемой инактивированных вакцин является то, что при инаktivации возбудителя утрачивается большая или меньшая часть его иммуногенной структуры под влиянием физико-химических воздействий на микробную клетку. Поэтому особенно важно, чтобы исходный материал для убитых вакцин содержал антиген в максимально высоких концентрациях. Отсюда необходимость введения больших доз, многократность прививок. Отсутствия возможности размножения и репликации антигена в организме привитых животных ведет к ограниченной циркуляции его, а также недостаточному вовлечению клеток иммунной системы, что в конечном результате приводит к низкому

индексу иммуногенности инактивированной вакцины. Повышение иммуногенности инактивированных вакцин осуществляется селекцией иммуногенных штаммов возбудителя и добавлением к ним адьювантов, которые усиливают стимуляцию иммунной системы у прививаемых животных, но не действуют сами по себе как антиген.

Вакцины феноловые (фенолвакцины) — препараты из культур микроорганизмов, инактивированных фенолом.

Вакцины химические или молекулярные — препараты из отдельных фракций микробных клеток, полученных ферментативным расщеплением микробной клетки.

Имунные сыворотки — это препараты, которые содержат готовые антитела и используются для создания пассивного иммунитета в наиболее короткие сроки. Сывороточные препараты получают путем специальной обработки крови искусственно иммунизированных животных. Имунные сыворотки используют для экстренной профилактики заболеваний с коротким инкубационным периодом, а также для лечения уже развивающихся заболеваний.

Сыворотки вводят в определенных дозах внутримышечно, подкожно, иногда внутривенно с обязательным соблюдением всех правил асептики и предварительной десенсибилизации. Чем раньше вводят сыворотку, тем больше выражено ее лечебное и профилактическое действие.

Имунные сыворотки получают на биофабриках путем гипериммунизации животных (лошадей, волов, свиней, овец, кроликов) соответствующими антигенами по специальным схемам.

Продолжительность защитного действия сывороток (пассивный иммунитет) составляет 8-14 дней.

Различают сыворотки:

-*Сыворотки моновалентные* — сыворотки, содержащие антитела к возбудителю одной инфекции.

-*Сыворотки поливалентные* — сыворотки, содержащие антитела к возбудителю двух и более инфекций.

-*Сыворотки реконвалесцентов* — сыворотки переболевших животных.

Лечебные и профилактические сыворотки выпускают в очищенном виде. *Сыворотки имунные лечебные* —используемые для лечения животных. Их обрабатывают осаждением глобулинов сернокислым аммонием, фракционированием, методом

ультрацентрифугирования, электрофорезом, ферментативным гидролизом, которые позволяют удалять до 80% балластных белков. Такие сыворотки обладают лучшими лечебными и профилактическими свойствами, содержат наименьшее количество балластных белков, оказывают менее выраженное токсическое и аллергическое действие.

Выпускаемые сыворотки подразделяются на анитоксические, анти микробные, противовирусные. К анитоксическим сывороткам относятся противодифтерийная, противоботулиническая, противостолбнячная, против газовой анаэробной инфекции, сыворотка против рожи свиней и т.д. Они назначаются в МЕ (международная единица) в соответствии с существующими инструкциями или наставлениями. Антимикробные сыворотки применяют против ряда болезней в виде гамма-глобулинов. Гамма-глобулины получают методом фракционирования сывороточных белков с помощью спиртоводных смесей при температуре ниже 0°. Разделение белковых фракций основано на различной их растворимости при изменении концентрации спирта, рН и содержания электролитов. Разработаны методы, которые позволяют получать стабильные, электрофоретически чистые препараты гамма-глобулина с выходом, составляющим 8 - 10% от общего белка сыворотки.

Глобулины из крови гипериммунизированных лошадей применяют против сибирской язвы, чумы, оспы, бешенства, клещевого энцефалита и других заболеваний.

За последние годы выпускают специфические гамма-глобулины направленного действия против многих инфекционных болезней, вызываемых бактериями и вирусами. Их получают от доноров, иммунизированных против данной инфекции. Такие гамма-глобулины содержат более высокий титр антител.

Сыворотки иммунные диагностические — сыворотки крови животных, иммунизированных микробными антигенами.

Диагностические иммунные сыворотки в условиях лабораторной применяют для постановки серологических реакций с целью идентификации выделенных микроорганизмов и обнаружения растворимых белков микробного происхождения. Готовят их путем гипериммунизации кроликов или других животных микробными или вирусными антигенами. Используют агглютинирующие сыворотки (сальмонеллезные, колибактериозные, листериозные и др.).

Фагодиагностика – диагноз посредством идентификации бактерии с помощью специфических фагов.

Фаготерапия – лечение животных и человека введением специфических бактериофагов.

Фагопрофилактика – применение соответствующих бактериофагов для предупреждения болезней.

Контрольные вопросы:

1. Что относится к биологическим препаратам?
2. Вакцины и их назначение?
3. Типы и виды вакцин. Какие вакцины Вы знаете?
4. Что такое иммунные сыворотки?
5. Что такое лечебные и профилактические сыворотки?
6. Что такое диагностические иммунные сыворотки?
7. Что такое фагодиагностика, фаготерапия, фагопрофилактика?

Иммунотерапия инфекционных заболеваний. Практическое использование феномена иммунитета

Иммунопрофилактика сибирской язвы.

Сибирская язва распространена на всех континентах, но преобладает в странах Азии, Африки, Южной Америки.

Сибирская язва — антропозоонозная инфекция. Основным источником распространения возбудителя сибирской язвы являются больные сельскохозяйственные животные. Среди животных чаще всего болеют травоядные, которые заражаются при заглатывании спор во время выпаса или при поедании загрязненных кормов. У животных преобладают кишечная и септическая формы заболевания. С мочой и испражнениями животные выделяют бактерии сибирской язвы в окружающую среду. Летальность среди животных высокая.

Иммунопрофилактика сальмонеллеза.

Сальмонеллез - остро протекающее контагиозное заболевание, сопровождающееся поражением желудочно-кишечного тракта, печени, увеличением селезенки и повышением температуры тела. Болезнь относится к числу опасных зоонозных инфекций. Сальмонеллезом болеют все виды сельскохозяйственных, домашних, промысловых, диких, лабораторных животных и птиц, особенно восприимчив молодняк.

Средства активной иммунопрофилактики сальмо.

Живые вакцины	аттенуированные	Инактивированные вакцины
Вакцины для крупного рогатого скота		
Из аттенуированного штамма Sal. dublin №6	Концентрированная фарمولквасцовая сальмонеллеза телят	против
Бивалентная из аттенуированных штаммов штамма Sal. dublin №6 и Sal. thyphimurium №3	Вакцина колибактериоза, клебсиеллеза, протейной инфекции с/х животных и пушных зверей	ОКЗ (против сальмонеллеза, протейной инфекции пушных зверей)
Вакцины для свиней		
Сухая, живая из штамма TC-177 Sal. choleraesuis	Вакцина против сальмонеллеза (паратифа) choleraesuis-50%, thyphimurium-25%, Sal. dublin-25%)	против поросят (Sal. Sal. Sal.)
Бивалентная из аттенуированных Sal. choleraesuis №9 и Sal. thyphimurium №3	Ассоциированная вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза choleraesuis+4 штамма, P. multocida+4 штамма, Str. septicus)	против поросят (Sal. P. P.)
Вакцина для овец		
Сухая, живая из штамма Sal. thyphimurium №3	Формолтимерсальная вакцина против сальмонеллеза овец	вакцина
Вакцина для пушных зверей		
	Поливалентная формолтимерсальная вакцина против колибактериоза, сальмонеллеза пушных зверей	вакцина
Вакцина для лошадей		
	Вакцина против сальмонеллезного аборта лошадей	
Вакцина для птиц		
Сухая, живая против сальмонеллеза водоплавающих птиц из Sal. thyphimurium	Формолтимерсальная вакцина против колибактериоза, сальмонеллеза пушных зверей, птиц, телят и поросят (Sal. choleraesuis, Sal. thyphimurium, Sal. dublin)	вакцина
Сальмофарг – вакцина (Sal. enteritica + бактериофарг)		

Иммунопрофилактика пастереллеза.

Пастереллез, геморрагическая септицемия — контагиозная инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением и отеком легких, плевры, а при подостром и хроническом течении - гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом и иногда энтеритом.

Средства активной иммунопрофилактики пастереллеза

Живые вакцины	аттенуированные	Инактивированные вакцины
Вакцины для крупного рогатого скота		
		-эмульгированная для КРС и буйволов
		-полужидкая для КРС; -поливалентная против пастереллеза с/х животных; -ассоциированная против пастереллеза и лептоспироза КРС,
Вакцины для свиней		
		-эмульгированная для свиней
		-поливалентная против пастереллеза с/х животных; -ассоциированная против пастереллеза, сальмонеллеза и стрептококкоза поросят.
Вакцина для овец		
		-преципитированная для овец; -поливалентная против пастереллеза с/х животных
Вакцина для пушных зверей		
Вакцина для лошадей		
		-поливалентная против пастереллеза с/х животных.
Вакцина для птиц		
живая вакцина: из пастеровского штамма (для всех видов домашней птицы), из штамма АВ и К Краснодарский НИВС (для водоплавающей птицы)		-поливалентная фармовакцина, эмульгированная против пастереллеза птиц.

Иммунопрофилактика бруцеллеза.

Бруцеллез - хронически протекающая болезнь животных и человека, вызываемая бактериями, объединенными под общим названием *Brucella*. Объединенный комитет экспертов Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по бруцеллезу рекомендует классификацию, согласно которой род *Brucella* подразделен на шесть видов: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotome*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*.

Средства активной иммунопрофилактики бруцеллеза

Живые вакцины	аттенуированные	Инактивированные вакцины
Вакцины для крупного рогатого скота		
Вакцина из штамма <i>Br. abortus</i> 19 содержащая в 1 дозе для крупного рогатого скота		Адьювант-вакцина ВИЭВ неагглютиногенная, из R-форм бруцелл штамма KB 17/100, <i>Br. abortus</i> , полученного из штамма 104М
Вакцина из штамма <i>Br. abortus</i> 104-М		БИП-вакцина - бруцеллезная иммунопотенцированная
Вакцины из штамма <i>Br. abortus</i> 82		
Вакцина из штамма 75\79 селекционированного из штамма 82		
Вакцина для овец		
Вакцина из штамма <i>Br.melitensis</i> Rev-1		

РАЗДЕЛ III. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

15. Возбудитель сибирской язвы

Сибирская язва (карбункул злокачественный, антракс) — особо опасная инфекционная болезнь сельскохозяйственных и диких животных всех видов, а также человека. Болезнь протекает молниеносно, сверхостро, остро и подостро (у овец и крупного рогатого скота), остро, подостро и ангинозно (у свиней), преимущественно в карбункулёзной форме — у человека. Характеризуется интоксикацией, развитием серозно-геморрагического воспаления кожи, лимфатических узлов и внутренних органов; протекает в кожной или септической форме (также у животных встречаются кишечная и легочная формы).

История открытия. Сибирская язва, известная с древнейших времен под названиями «священный огонь», «персидский огонь» и др., неоднократно упоминалась в сочинениях античных и восточных писателей и учёных. Подробное описание клиники этой болезни было сделано французским врачом Мораном в 1766 году. В дореволюционной России ввиду преимущественного распространения в Сибири это заболевание получило название сибирской язвы, когда русский врач Андреевский (1788 г.) описал в сочинении «О сибирской язве» крупную эпидемию этой инфекции в западносибирских губерниях, а в опыте самозаражения установил идентичность сибирской язвы животных и человека и доказал возможность её передачи от животных к людям. Приоритет открытия возбудителя сибирской язвы принадлежит Ф. Полендеру (1849) в Германии, П. Райе и К. Давену (1850) во Франции. В 1876 г. Р. Кох выделил культуру возбудителя и выявил феномен спорообразования. В 1881 г. Л. Пастер провел первые успешные опыты вакцинации животных ослабленными культурами. Через два года в России Л. С. Ценковский изготовил 1-ю и 2-ю вакцины против сибирской язвы, которые применяли в нашей стране в течение 80 лет. В 1888 г. И. Нильсен описал основные признаки болезни. В России болезнь впервые описал в 1929 г. К.П. Андреев.

Устойчивость. Сибирезязвенная бактерия вне организма при доступе кислорода воздуха образует споры, вследствие чего обладает большой устойчивостью к высокой температуре, высушиванию и дезинфицирующим веществам. Споры могут

сохраняться годами; пастбище, заражённое испражнениями и мочой больных животных, может долгие годы сохранять сибиреязвенные споры. Вегетативные формы сибиреязвенной палочки быстро погибают при кипячении и воздействии обычных дезинфектантов. При автоклавировании споры при температуре 110 °С гибнут лишь через 40 мин. Сухой жар при температуре 140 °С убивает споры через 2,5—4 ч. Прямые солнечные лучи споры сибирской язвы выдерживают в течение 10—5 суток. Споридиальным действием обладают также активированные растворы хлорамина, горячего формальдегида, перекиси водорода.

Морфология. Возбудитель сибирской язвы - аэроб или факультативный анаэроб.

Возбудитель сибирской язвы — бацилла антрацис (*Bacillus anthracis*) - крупная спорообразующая грамположительная палочка, хорошо красится всеми анилиновыми красителями. Встречается в трех формах — вегетативной бескапсульной, вегетативной капсульной и споровой. Размеры вегетативных клеток 1-1,5 x 6-10 мкм, спор 0,8-1x1,5 мкм. В мазках с питательных сред бескапсульные палочки образуют длинные цепочки, концы микробов в окрашенных препаратах обрублены или несколько вогнуты, цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями.

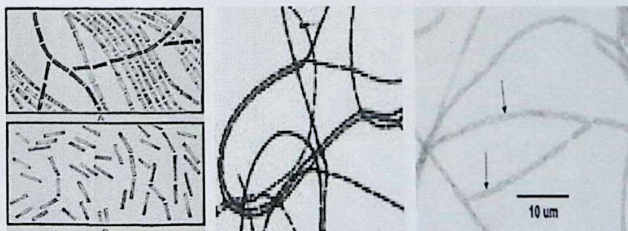


Рис.33. Морфология клеток *B.anthraxis* в мазках с плотных и жидких питательных сред. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В препаратах из патологического материала палочки расположены поодиночке, попарно или короткими цепочками, окружены капсулой, зачастую общей для группы клеток.



Рис. 34. Морфология клеток *B.anthraxis* в мазках из патологического материала от больных. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. Хорошо размножается на простых питательных средах. Оптимальная температура роста 34 –37 °С, оптимальное значение рН -7,2-7,5. Характер роста на плотных и жидких питательных средах. Минимальные питательные потребности сибирязявленного микроба удовлетворяются 5-10 аминокислотами и тиамином.

На обычных плотных питательных средах (агар Хоттингера, МПА) сибирязявленный микроб образует после суточной инкубации при 35-37° С крупные шероховатые матовые колонии в R-форме, с «шагреновой» поверхностью, с неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или «львиную гриву» (R-форма).

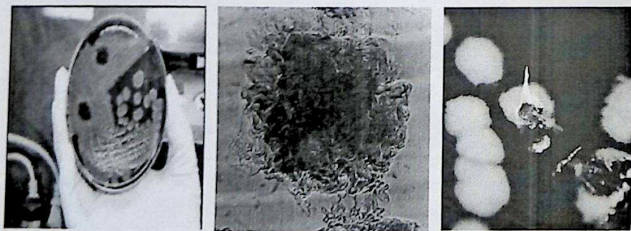


Рис. 35. Морфология колоний *B.anthraxis* на плотных питательных средах. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На бикарбонатно-сывороточном агаре при культивировании в атмосфере с 5-50% CO₂ микроб формирует гладкие, слизистые, блестящие, полупрозрачные колонии (SM-форма)

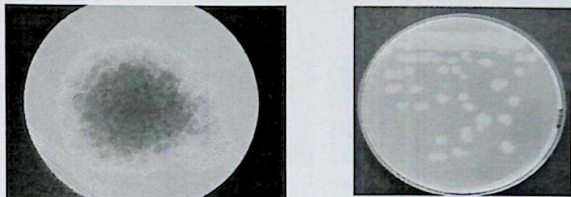


Рис. 36. Морфология колоний *B.anthraxis* на плотных питательных средах. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На мясо-пептонном бульоне или бульоне Хоттингера сибиреязвенный микроб растет в виде «комочка ваты», трудно разбивающегося при встряхивании, при этом бульон остается прозрачным.

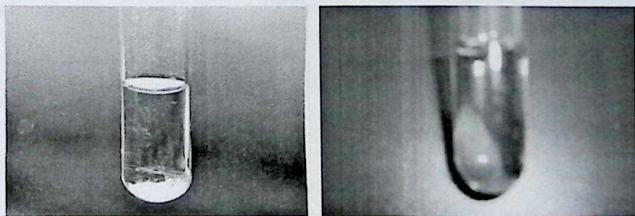


Рис. 37. Морфология колоний *B.anthraxis* на жидких питательных средах. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Сибиреязвенный микроб неподвижен, в отличие от многих близкородственных бацилл. При засеве уколом в столбик полужидкого агара рост наблюдается только по ходу укола, а не диффузно.

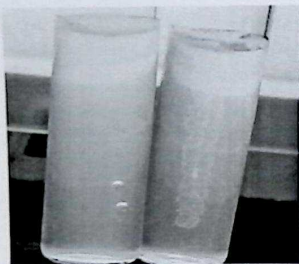


Рис. 38. Рост *B.anthraxis* на полужидком агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

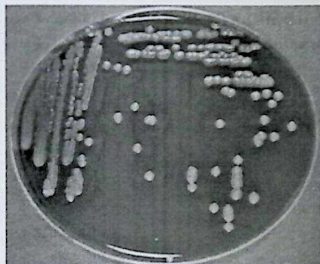


Рис. 39. Рост *B.anthraxis* на кровяном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

При росте на кровяном агаре с 3-5 % дефибринированной крови барана гемолиз не наблюдается, в то время как большинство сапрофитов дают быстрый гемолиз (через 12-18 ч при 37 °С).

Типичные вирулентные штаммы *B.anthraxis* образуют капсулу только в живом организме или при культивировании в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ на специальных питательных средах, содержащих сыворотку и бикарбонат натрия (1% бикарбонатно-сывороточный агар, жидкая среда ГКИ(60% раствора Хэнкса и 40% лошадиной или бычьей сыворотки). На 1% бикарбонатно-сывороточном агаре формируются колонии в SM-форме.

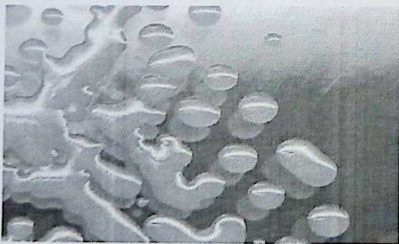


Рис. 40. Морфология колоний *B.anthraxis* на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для окраски капсулы необходимы специальные методы:

1. По методу Ребигеракарболовым генцианвиолетом (клетки окрашены в синий цвет и окружены бесцветными или слабо розовыми капсулами)

2. По методу Гинсакарболовым фуксином Циляна фоне черной туши (клетки окрашены в розово-малиновый цвет, капсулы бесцветны)

3. По методу Бури (негативное контрастирование прижизненного препарата, на темном фоне выявляются прозрачные неокрашенные зоны капсул вокруг микробных клеток)

4. Люминесцирующими капсульно-соматическими сыворотками при люминесцентной микроскопии (вокруг темной клетки светящаяся ярко-зеленая капсула)

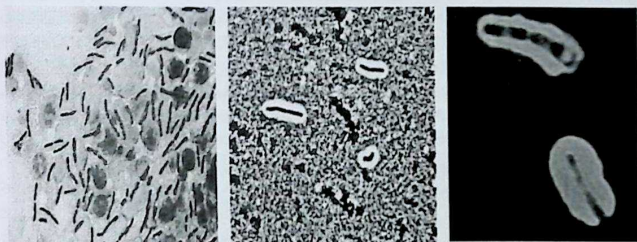


Рис. 41. Капсулообразование *B. anthracis*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Сибиреязвенный микроб при неблагоприятных условиях существования способен формировать споры. В каждой вегетативной клетке образуется только одна спора. Форма спор овальная, расположение центральное, диаметр споры не превышает поперечника микробной клетки. Спорообразование происходит вне живого организма, в условиях внешней среды или на питательных средах при свободном доступе кислорода, дефиците питательных веществ, определенной влажности, нейтральной или слабощелочной среде, при температуре 26-37 °С. При температуре выше 43 °С и ниже 12 °С спорообразование прекращается. Биологическая роль спор прежде всего заключается в том, что они являются формой защиты спорообразующих

бактерий от вредного воздействия окружающей среды и тем самым выполняют функцию сохранения вида.

Споры способны долго сохранять генетический материал исходных клеток и обеспечивать передачу основных свойств потомству в последующих генерациях.

Образование споры – многостадийный процесс, в котором выделяют 7 стадий:

Стадия 0 –вегетативная клетка

Стадия I –образование палочковидной структуры: после удвоения нуклеоидов они объединяются в палочковидную структуру.

Стадия II –образование поперечной перегородки: в результате несимметричного деления образуется поперечная перегородка, отделяющая один из нуклеоидов, конденсирующийся у полюса клетки, и цитоплазму меньшей по размеру клетки, которой предстоит превратиться в спору, от остального клеточного содержимого. **Стадия III–поглощение проспоров :** за образованием перегородки не следует развития поперечной стенки, как при обычном делении. Вместо этого мембрана большей клетки быстро обволакивает малую, которая оказывается полностью окруженной цитоплазмой большей клетки -формируется **проспора**.

Стадия IV –синтез кортекса: в результате «поглощения» большейклеткой проспора оказывается покрытой двумя слоями обычных мембран: собственной мембраной и мембраной материнской клетки. Сразу после «поглощения» проспоров происходит синтез и формирование новых структур, окружающих ее. Первым между наружной и внутренней мембранами образуется новый слой, **кортекс**. Он состоит из особого пептидогликана, отличающегося от пептидогликана вегетативных клеток. **Стадия V –синтез оболочки:** поверх наружной мембраны образуется более электронноплотный слой - **оболочка споры**. У сибиреязвенного микроба вокруг оболочки образуется еще один, менее плотный и более тонкий слой, **экзоспориум**.

Стадия VI –Созревание: по мере образования этих слоев проспора превращается в спору. Одновременно с образованием оболочки спор происходит поглощение Ca^{++} , затем следует синтез дипикотиновой кислоты. Образующееся хелатное соединение **дипиколит кальция** составляет от 10 до 15 % веса сухой споры и локализовано внутри ее протопласта. В процессе этого спора

приобретает термостабильность и высокий показатель светопреломления. Наружная оболочка споры, составляющая от 30 до 60% ее веса, состоит из белков, на долю которых приходится до 80% всех белков споры. Они отличаются необычно высоким содержанием цистеина и гидрофобных аминокислот и чрезвычайно устойчивы к различным воздействиям, приводящих к растворению большинства белков. В протопласте зрелой споры содержится очень много дипикколината кальция, а сам протопласт окружен новосинтезированными наружными слоями уникальной структуры (кортексом, оболочкой и экзоспориумом). Эти слои по весу составляют весьма значительную часть споры.

Стадия VII –лизис и высвобождение споры: в результате автолиза материнской клетки эндоспора высвобождается. Она сильно обезвожена, не проявляет заметной метаболической активности и надежно защищена от тепловых и радиационных повреждений, а также от химических и ферментативных воздействий. Спора остается в таком криптобиотическом состоянии до тех пор, пока ряд внешних воздействий не инициирует ее превращение в новую вегетативную клетку.

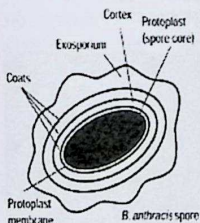


Рис. 42. Строение споры *B.anthraxis*.
Займствовано из
Интернет-ресурсов



Рис.43.
Спорообразование
B.anthraxis.
Займствовано из
Интернет-ресурсов



Рис. 44. Покоящаяся
спора *B.anthraxis*.
Займствовано из
Интернет-ресурсов

Биохимические свойства. Сибиреязвенный микроб биохимически активен - способен разлагать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу и некоторые другие сахара, но не разлагает лактозу. Сибиреязвенный микроб в средах,

содержащих неорганический пирофосфат, в отличие от сапрофитных бацилл, не образует щелочную фосфатазу, следовательно, не способен разлагать органические фосфаты, добавляемые в питательную среду (отрицательный тест на щелочную фосфатазу). Для корректной постановки этого теста необходимо, чтобы в среде содержалось не менее 0,4 г/л неорганического пирофосфата.

Антигенная структура. Антигены сибиреязвенного микроба тесно связаны с различными структурными элементами микроба. Известен антиген *B. anthracis*, состоящий из полипептида **d-глутаминовой кислоты** и составляющий основную массу капсульного вещества. Его синтез кодирует плазида рХО2. Этот антиген отличается слабыми иммуногенными свойствами. Другой антиген – **соматический**, входящий в клеточную стенку микроба, имеющий белково-полисахаридную природу. Этот антиген термостабильный, не разрушается при кипячении, используется при постановке реакции термопреципитации по Асколи, с помощью которой выявляют соматический антиген в различных материалах животного происхождения (трупях, коже, шерсти животных). Идентифицированы также белки S-слоя клеточной стенки **Sap** и **EA1**, обладающие антигенной активностью.

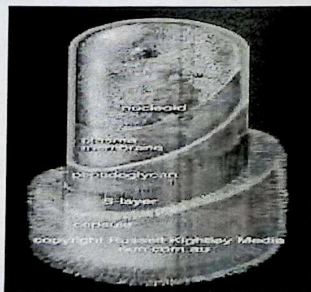
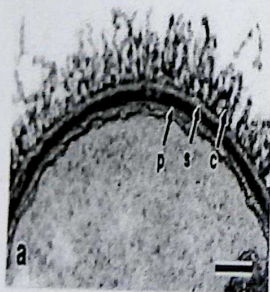


Рис. 45. Антигенная структура С –капсула; S –S-слой; P – пептидогликановый слой. Заимствовано из Интернет-ресурсов

В настоящее время считается общепризнанным наличие у возбудителя сибирской язвы двух белковых экзотоксинов –

отечного и летального, которые формируются из трех компонентов, синтезируемых бактериальной клеткой: **протективного антигена, отечного фактора и летального фактора**. Все они кодируются плазмидой рХО1. Эти три белковых фактора не являются самостоятельными токсинами, и только комплексы отечного и летального факторов с протективным антигеном образуют соответствующие токсины с присущей каждому из них специфической биологической активностью. В токсинном бинарном комплексе *B. Anthracis* роль субъединицы В выполняет протективный антиген, а А-субъединицами выступают отечный или летальный факторы. **Протективный антиген** - белок с молекулярной массой 83 кДа, который связывается с высокоаффинными рецепторами на поверхности клеток-мишеней.

Отечный фактор *B. Anthracis* является ферментом аденилатциклазой с молекулярной массой 89 кДа. **Летальный фактор** сибиреязвенного микроба идентифицирован как термолизин-подобная цинк-содержащая металлоэндопептидаза (м.м. 90 кДа), специфичная в отношении киназмитоген-активируемой протеинкиназы.

Факторы патогенности. Патогенность возбудителя обусловлена его способностью, образовывать капсулу и специфический экзотоксин.

Патогенез. Считают, что патогенез сибирской язвы обусловлен преимущественно, если не исключительно, действием экзотоксинов.

Независимо от того, каким путем споры возбудителя попадают в организм – через поврежденную кожу или слизистые оболочки, на месте внедрения некоторая часть спор прорастает в инкапсулированные вегетативные клетки, продуцирующие компоненты токсинов. Развивается местный отек и некроз тканей. Большая часть спор из повреждений кожи, слизистых или альвеол захватывается макрофагами. Макрофаги выполняют несколько функций – фагоцитируют опсонизированные клетки и переваривают их, но так как микроб имеет несколько механизмов, препятствующих опсонизации, фагоцитоз остается незавершенным. В фагоцитах споры прорастают, формируют инкапсулированные вегетативные клетки, противостоящие фагоцитозу и продуцирующие токсины. Фагоциты выполняют роль «тройного коня», разнося возбудитель по лимфатическим сосудам.

Одновременно из фагоцитов освобождаются инкапсулированные клетки возбудителя, попадающие в регионарные лимфоузлы, вызывая регионарный геморрагический лимфаденит. Преодолев этот барьер, клетки и токсины разносятся лимфогенными гематогенным путями по органам, вызывая септицемию и токсемию. Токсины поражают разные клетки, макрофаги, в которых высвобождаются различные цитокины свободные оксиданты, что приводит к развитию вторичного шока.

Диагностика. Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических данных, клинических признаков и результатов аллергического, серологического, патологоанатомического, бактериологического и биологического исследований. Лабораторную диагностику сибирской язвы проводят в соответствии с действующими Методическими указаниями по лабораторной диагностике сибирской язвы у людей и животных, обнаружению возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды.

Исследование на сибирскую язву включает:

- *высевы на питательные среды,
- *микроскопию мазков из исходного материала,
- *постановку основных и дополнительных методов идентификации,
- *использование МФА для антигенов и антител к ним,
- *постановку ПЦР,
- *проведение биопробы,
- *применение реакции преципитации
- *применение реакции непрямой гемагглютинации

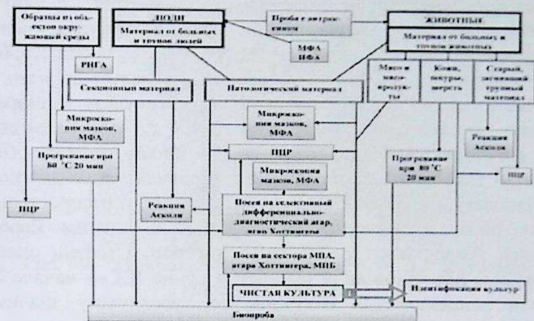
Забор материала от животных

1. Для бактериологического исследования:

1. в случае падежа животного с подозрением на сибирскую язву – ухо и мазок из надреза:

2. если подозрение возникло во время вскрытия, то манипуляции по вскрытию прекращают и на исследование направляют кровь, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов), костный мозг. У трупов свиней – заглоточные лимфоузлы;

3. у больных животных – кровь из яремной вены, или из вены уха, хвоста



Дифференциальный диагноз. Необходимо исключить бродзот (для данной болезни характерна кровавой понос и тимпания, часто появляются отеки в области шеи, подгрудка), энтеротоксемию (размягченная почка), эмкар (наличие в мышцах крепитирующих припухлостей).

Контрольные вопросы:

1. История открытия
2. Опишите морфологические и тинкториальные свойства возбудителя сибирской язвы
3. Расскажите о культуральных свойствах возбудителя сибирской язвы
4. Расскажите о патогенезе возбудителя сибирской язвы
5. Как осуществляется лабораторная диагностика возбудителя сибирской язвы

16. Возбудитель туберкулеза

Туберкулез – инфекционная, хронически протекающая болезнь животных всех видов и человека, характеризующаяся поражением органов и тканей с образованием в них бугорков-туберкулов.

История открытия. Туберкулез известен с глубокой древности. IV в. до н. э. - Гиппократ описал туберкулез у человека. 1819 г. - впервые ввел название «туберкулез» ученый К. Леннек. 1865 г. - Ж. А. Виллемен доказал заразный характер болезни. 1882-1890 гг. - Р. Кох открыл возбудителя туберкулеза и разработал методику изготовления туберкулина. 1924 г. - А. Кальмет и С. Герен изготовили вакцину БЦЖ (BCG - *Bacillus Calmett - Guerin*). 1891 г. - Р.Г. Гутман предложил туберкулин для диагностики туберкулеза у животных. Туберкулез животных распространен во многих регионах мира, лишь в развитых странах Европы и Северной Америки он почти ликвидирован. Степень опасности туберкулеза для человека возрастает: в конце XX — начале XXI в. мировая эпидемическая ситуация по туберкулезу значительно ухудшилась.

Морфология. Возбудитель бактерии рода *Mycobacterium*, в который входят более 38 самостоятельных видов. Болезнь у животных вызывают микобактерии туберкулёза бычьего (*M. bovis*), человеческого (*M. Tuberculosis*) и птичьего (*M. Avium*) видов.

Возбудители туберкулеза имеют форму палочек 0,2-0,6 мкм в ширину и 16 мкм в длину, являются высокоустойчивыми к действию химических дезинфицирующих средств.

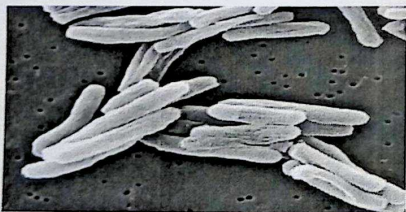


Рис. 47 – Микобактерии туберкулеза: – компьютерное изображение. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Возбудитель обладает хорошо развитой клеточной стенкой со значительным содержанием восколипидного вещества. Микобактерии неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу

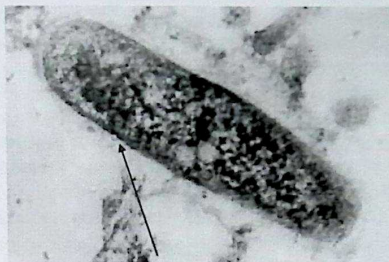


Рис. 48 – Микрокапсула микобактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Это обуславливает характерный для микобактерий признак - кислото-спиртоустойчивость, т.е. при окраске основными красителями (карболовый фуксин) они не обесцвечиваются 95%-ным этанолом с добавлением 3% соляной кислоты. На этом основан метод дифференциальной окраски по Циль-Нильсену, в результате чего микобактерии окрашиваются в рубиново-красный цвет, а все остальные микроорганизмы и окружающий субстрат - в синий.



Рис. 49. Окраска возбудителя туберкулеза по Цилью-Нильсену. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. Туберкулезные микобактерии размножаются в строго аэробных условиях на соответствующих селективных питательных средах, содержащих в определенных

соединениях углерод, азот, водород и кислород. Из минеральных веществ необходимыми оказались фосфор, калий, магний и сера. Стимулирующим влиянием обладают соли железа. Для культивирования возбудителя посе́вы проводят на питательные среды: яичные среды Левенштейна-Йенсена, глицериновые агаровые среды Миддлбука, Петраньяни, Гельберга, полусинтетическая среда Школьниковой, синтетические среды Сотона, Дюбо.

Оптимальная температура культивирования:

- 37-38 °C для *M. tuberculosis*;
- 38-39 °C для *M. bovis*;
- 39-41 °C для *M. avium*;

Возбудители туберкулеза при посеве из патологического материала растут медленно, срок культивирования 7-30 дней и более.

Наиболее часто для выращивания микобактерий используют плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена и Финна-2. Эти среды рекомендованы ВОЗ в качестве стандартных при диагностике туберкулеза. Они выпускаются в готовом виде в специальных пробирках с завинчивающимися пробками, предохраняющими среду от высыхания (рисунок 50).

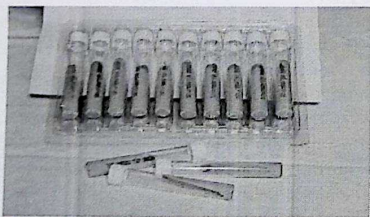


Рисунок 50 – Питательная среда Левенштейна-Йенсена.
Займствовано из Интернет-ресурсов

На жидких питательных средах характеризуется наличием рыхлой, матовой, крошкоподобной или сплошной, морщинистой, блестящей пленки соответствующего цвета, на плотных средах микобактерии растут в виде S- или R-форм крошкоподобных мелких либо крупных, блестящих или матовых единичных

обособленных колоний или же сплошных скоплений, а также в виде морщинистого налета белого или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета. Вирулентные культуры *Mycobacterium bovis* на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. *Mycobacterium tuberculosis* также растут в виде сферических колоний, которые встречаются как в R-, так и в S-форме. *Mycobacterium avium* растут гладкими, мелкими, круглыми, белыми, блестящими, с ровными краями колониями, располагающимися как единично, так и скоплениями или в виде сплошного слизистого налета.

На среде Левенштейна-Йенсена на 15-40 день культивирования микобактерии туберкулеза образуют неправильной формы шероховатые плотные крошковатые колонии кремового цвета (цвет “слоновой кости”) бородавчатого вида, напоминающие кочаны цветной капусты (рисунок 51).

Рост микобактерий

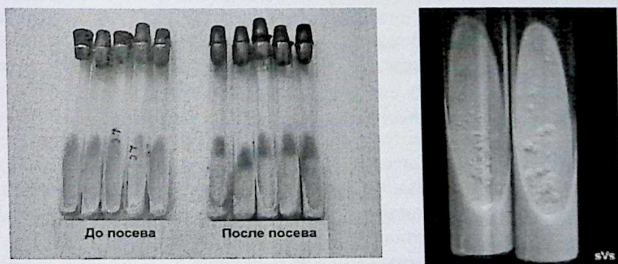


Рис. 51 – Характер роста микобактерий туберкулеза на среде Левенштейна- Йенсена. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства. Для биохимической дифференциации микобактерий используют тесты: ниациновый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, разрушение салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота,

устойчивость к 5 %-ному хлориду натрия, пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Факторы патогенности. Каждый из них является патогенным для животных соответствующего вида или человека, возможно и перекрестное заражение. Микобактерии туберкулёза бычьего вида патогенны для крупно рогатого скота. К ним также восприимчивы все млекопитающие животные и человек. К возбудителю туберкулёза человеческого вида восприимчивы, кроме человека, свиньи, козы, кошки, собаки. Возбудитель птичьего вида вызывает патологические изменения не только у домашней и дикой птицы, но и у свиней.

Патогенез. Развитие патологического процесса при туберкулезе зависит от резистентности организма и степени вирулентности возбудителя.

Возбудитель туберкулеза проникнув в организм с кормом в пищеварительный тракт, или с вдыхаемым воздухом, туберкулезные микобактерии попадают в легкие, мезентериальные лимфоузлы, или другие органы лимфогенным и гемогенным путями. На месте внедрения возбудителя развивается воспалительный процесс, проявляющийся клеточной пролиферацией и экссудацией. Вначале вокруг возбудителя появляются лейкоциты, которые фагоцитируют и частично разрушают микобактерии, но сами при этом погибают. Затем на этом месте размножаются моноциты и гистиоциты, которые поглощают освободившиеся микобактерии и некротизируются. По периферии воспалительного очага они дифференцируются в лимфоидные, эпителиоидные и гигантские клетки. Экссудат, скопившийся между клетками, свертывается, образуя сеть фибрина, формируется бессосудистый узелок – туберкул. Под действием токсинов и в результате нарушения питания ткань внутри узелка некротизируется, пропитывается известковыми солями, превращаясь в сухую крошковатую массу, напоминающую творог (казеоз). Если же резистентность организма снижена, происходит расплавление стенок туберкула, возбудитель проникает в лимфу и кровь и происходит генерализация инфекции в организме с образованием туберкулов в различных органах и тканях. Когда на месте внедрения возбудителя имеет место продуктивное воспаление, туберкулы подвергаются фибринозному перерождению и превращаются в плотные бугорки. Такой характер

течения наблюдается чаще всего на плевре, брюшине и называется «жемчужница».

Диагностика. В соответствии с Руководством по диагностическим испытаниям и вакцинам для наземных животных 2018 (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018) Международного эпизоотического бюро, рекомендуются нижеуказанные методы диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Диагноз на туберкулез устанавливается комплексно на основании результатов аллергических, патологических и бактериологических исследований с учетом эпизоотологических данных. Клинические признаки заболевания в настоящее время встречаются редко; если даже и встречаются, то они нехарактерные (кашель, исхудание, увеличение лимфатических узлов и т.д.).

Достаточно эффективно и экономически оправдано изучение свойств выделенной культуры по сокращенной схеме, в которой основное внимание уделяется срокам появления первичного роста колоний, пигментообразованию, культурально-морфологическим и тинкториальным свойствам при окраске по Цилю-Нильсену.

Для идентификации выделенных микобактерий можно применять постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР), ИФА.

В качестве дополнительных методов диагностики туберкулеза применяют симультанную аллергическую пробу, серологическое и гистологическое исследования.

Аллергическая диагностика. Основным методом прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота является внутрикожная проба с туберкулином очищенным для млекопитающих. В настоящее время туберкулин получают из культурального фильтрата микобактерий, выращенных на синтетической питательной среде, путем осаждения протеиновой фракции (PPD) трихлоруксусной кислотой и сульфатом аммония. Туберкулин при внутрикожном введении позволяет выявлять инфицированных животных задолго до появления других признаков заболевания.

Аллергическое исследование с ППД-туберкулином для млекопитающих проводят в соответствии с наставлением по его применению. Результаты туберкулинизации учитывают через 72 часа путем осмотра, пальпации и измерения кожной складки в месте инъекции.

Для прижизненной дифференциальной аллергической диагностики у животных и птиц применяется симультанная внутрикожная проба: введение туберкулина для млекопитающих как основного аллергена для выявления больных туберкулезом животных (у птиц - туберкулина для птиц) и другого аллергена (туберкулина для птиц, КАМа, других сенситинов), способного в большей степени выявлять особи, инфицированные другими (нетуберкулезными) видами микобактерий. Препараты вводят внутрикожно в симметричные участки шеи с разных сторон. Учет реакции проводят через 72 часа, сравнивая наличие и интенсивность реакций. Симультанную аллергическую пробу с КАМ проводят в соответствии с наставлением. Ее применение рекомендовано через 30-45 дней после первого (или второго) планового исследования при условии выделения реагирующих на туберкулин животных

Серологическое исследование

Сущность метода заключается в выявлении комплемент-связывающих антител в сыворотке крови животных, инфицированных микобактериями туберкулеза, реакцией связывания комплемента (РСК).

Для дифференциации микобактерий применяют иммуноферментный анализ (ИФА). Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет выявлять антитела к микобактериям туберкулеза, то есть данный метод свидетельствует не о заболевании, а об инфицировании. Чувствительность метода колеблется от 68 до 90%.

Серологические методы не являются ведущими при диагностике туберкулеза.

Гистологическое исследование

Сущность метода заключается в выявлении в тканях животных, больных туберкулезом, микобактерий возбудителя болезни и характерных морфологических изменений.

Контрольные вопросы:

1. История открытия
2. Опишите морфологические и тинкториальные свойства микобактерий туберкулеза.
3. Расскажите о культуральных свойствах микобактерий туберкулеза

4. Расскажите о патогенезе туберкулеза
5. Как осуществляется лабораторная диагностика туберкулеза
6. Назовите методы и средства специфической диагностики туберкулеза
7. Когда диагноз на туберкулез считают установленным?
8. В каких случаях проводят аллергические пробы?

17. Возбудитель бруцеллеза

Бруцеллез (brucellosis) – хроническая инфекционная болезнь животных и человека. У многих животных проявляется абортами и задержанием последа, орхитами, рождением нежизнеспособного молодняка и бесплодием. В связи с социальной опасностью бруцеллез включен в список карантинных болезней.

Историческая справка. Симптомы бруцеллеза у людей были известны еще Гиппократу. В 1861 г. англичанин Ф. Марстон на острове Мальта дифференцировал бруцеллез у людей как самостоятельное заболевание. В 1897 г. бактериолог Д. Брюс открыл возбудителя болезни (по имени этого ученого в начале XX в. получили свое название и возбудитель, и болезнь). Английские исследователи А. Райт и Д. Семпл (1897) впервые предложили для диагностики бруцеллеза реакцию агглютинации. В конце XIX — начале XX в. аналогичные инфекции были выявлены у коров, овец, свиней, лошадей и других животных.

Бруцеллез животных широко распространен во многих странах мира. Он наносит значительный экономический ущерб из-за массовых аборт, яловости, выбраковки продуктивных животных, потери ценных производителей, нарушения племенной работы, затрат на противоэпизоотические мероприятия и т. д. Кроме того, больные животные служат основным источником заражения бруцеллезом человека.

Первые случаи бруцеллѐза животных были зарегистрированы в Казахстане в 1930 г., а плановое диагностическое тестирование на бруцеллѐз было введено в 1932 г. Колебания заболеваемости бруцеллѐзом животных в советское время можно объяснить применением различных стратегий борьбы с бруцеллѐзом. Обширные вакцинации КРС штаммом *B. abortus* S19 начались в 1955 г. и обеспечили 70 %-ный охват КРС до 1971 г. Согласно

эпидемиологическим данным, уровень заболеваемости значительно снизился, что привело к сокращению числа абортотворов в этот период. Тем не менее уровень обнаружения серопозитивных животных оставался высоким из-за невозможности дифференциации вакцинированных и инфицированных животных и длительного сохранения титра антибруцеллярных антител у вакцинированных животных. По этой причине вакцинации штаммом *B. abortus* S19 были прекращены в 1971 г. во многих регионах страны. Это оказало неблагоприятное влияние на эпизоотическую ситуацию, что привело к увеличению серопозитивных животных. Однако после распада Советского Союза и его экономики в 1991 г. сельскохозяйственные нормы устарели. Официально программа вакцинации продолжалась до 2006 г., однако реально не принесла результатов из-за отсутствия финансирования с 1992 г. С 2007 г. вакцинации были полностью отменены и заменены новой стратегией, которая включала общее диагностическое исследование животных с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и последующего убоя серопозитивных животных. В 2014 г. добровольная вакцинация КРС была включена в программу ликвидации бруцелллёза. Выбор вакцины в настоящее время является прерогативой ветеринарного врача и владельца КРС, который должен уведомить Государственную ветеринарную службу о своей деятельности. В настоящее время эпизоотологическая обстановка по бруцелллёзу остается весьма напряженной в Казахстане, особенно в северных и центральных регионах, где сосредоточено 75 % неблагополучных пунктов и выявляется 90 % больных животных от общего количества в республике. При изучении многолетней динамики (с 2009 по 2015 гг.) заболеваемости населения Республики Узбекистан бруцелллёзом был выявлен ряд закономерностей, связанных с территориальными особенностями, что в полной мере относится и к эпидемиологическому надзору за зоонозами. 2015 г. Высокая заболеваемость населения бруцелллёзом является подтверждением недостаточной эффективности проводившихся противобруцеллезных мероприятий.

По международной классификации род *Brucella* объединяет шесть видов бруцелл, подразделяемых на ряд биологических вариантов (биоваров): *Brucella melitensis* – возбудитель болезни у овец, коз и наиболее опасный для человека – включает 3

биовара; *Brucella abortus* – возбудитель бруцеллёза крупного рогатого скота, яков, буйволов, верблюдов, лошадей – 7 биоваров; *Brucella canis*, выделенная от собак; *Brucella neotomae*, выделенная от пустынной кустарниковой крысы в США. *Brucella suis* – возбудитель болезни у свиней – включает 5 биоваров, носителями 2-го биовара *Brucella suis* являются не только свиньи, но и зайцы, 4-го – олени, 5-го – мышевидные грызуны.

Морфология.

Бруцеллы – это полиморфные бактерии шаровидной, овоидной или палочковидной формы, расположены одиночно, парами, короткими цепочками, небольшими скоплениями. Размеры микробной клетки в среднем составляют 0,3-0,6 мкм для кокковых и 0,5-0,7 × 0,6-1,5 мкм – для палочковидных форм. Бруцеллы спор не образуют, не имеют таких распространенных факторов патогенности как капсула, пили, экзотоксины и токсины, кодируемые профагами, секретируемые протеазы и цитолизины, а также плазмид.

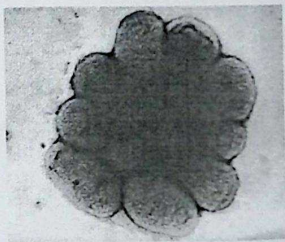
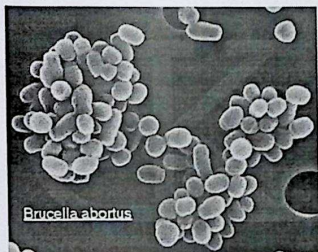


Рис. 52. Морфология *Brucella abortus*. Видны укороченные палочки с закругленными концами, образующие скопления.

Займствовано из Интернет-ресурсов

По морфологии L-формы бруцелл представляют собой полиморфные клетки в виде шаров, грушевидных и неправильной формы тел от 1 до 6 мкм с цитоплазмой разной оптической плотности с вакуолями зернистостью.

В микроскопических препаратах микробные клетки располагаются чаще всего беспорядочно, иногда формируют цепочки, а в некоторых случаях встречаются клетки, расположенные попарно в виде диплококков. Окрашиваются всеми анилиновыми красителями, грамотрицательны.

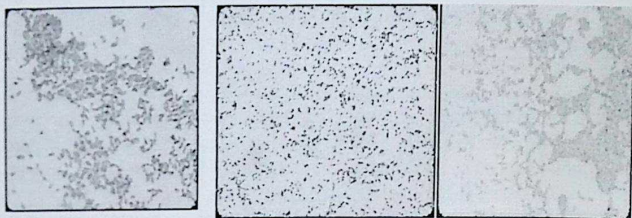
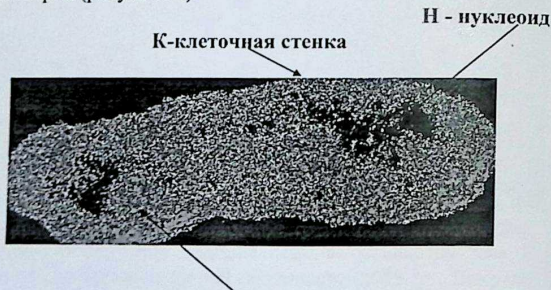


Рис. 53. Мазок из чистой культуры *B. melitensis* и *Brucella abortus*. Окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Бруцеллы неподвижные. Спор не образуют. При электронной микроскопии выявляются как одиночные бактерии, так и короткие стрептобактерии (рисунок 54).



ЦМ – цитоплазматическая мембрана

Рис.54 – Электронная микроскопия *B. melitensis*. КС – трехслойная клеточная стенка; ЦМ – цитоплазматическая мембрана, Н - нуклеоид КС ЦМН. Заимствовано из Интернет-ресурсов

К физическим и химическим факторам устойчивость бруцелл невысокая: в почве, воде, навозе, грубых кормах возбудитель сохраняет жизнеспособность до 4 мес.; прямые солнечные лучи убивают за 3-4 часа, нагревание до 90°C-100 °C – моментально. По устойчивости к дезинфицирующим средствам отнесены к 1-й группе возбудителей инфекционных болезней (малоустойчивы).

Культуральные свойства

Бруцеллы – аэробы или микроаэрофилы, в анаэробных условиях не растут. Для их культивирования используют среды с добавлением крови, сыворотки крови, глюкозы, глицерина: КА (кровяной агар), МППБ (мясо-пептонный печеночный бульон), ППГБ (печеночно-глюкозно-глицериновый бульон), ППГА (печеночно-глюкозно-глицериновый агар), печеночный агар Хеддльсона. Эти среды содержат 1% глюкозы и 2-3% глицерина. Факторами роста являются тиамин, ниацин, биотин. Бруцеллы хорошо растут на агаре из картофельного настоя с сывороткой крови, на сывороточно-декстрозном агаре, триптозно-соевом агаре, триптозном агаре, агаре Альбими, агаре Д. В настоящее время широко используется коммерческая среда для выделения бруцелл – эритрит-агар или бруцеллагар. Для выделения бруцелл из загрязненных посторонней микрофлорой материалов к питательным средам добавляют антибиотики (полимиксин, бацитрацин и др.), угнетающие постороннюю микрофлору и не препятствующие росту бруцелл. При первичном выделении бруцелл из инфицированного материала колонии формируются через 1-3 недели после посева. Особыми питательными потребностями обладают культуры вида *B. ovis*, для успешного культивирования которых обязательно внесение в состав среды 10 % нормальной кроличьей сыворотки или аминокептида.

Температурный оптимум для роста составляет 36-37 °C; pH 7,0-7,2 хорошо растут на питательных средах с добавлением сыворотки или крови. Особенностью *B. abortus* и *B. ovis* является потребность в повышенном содержании CO₂ (5-10 %) в атмосфере культивирования. Культуры бруцелл видов *B. suis* и *B. melitensis* растут в аэробных условиях, тогда как первые генерации культур *B. abortus* и *B. ovis* удастся выделить лишь в присутствии повышенного содержания углекислоты (5-10 %). При последующих пересевах культуры *B. abortus* утрачивают потребность в

повышенном содержании углекислоты в атмосфере культивирования и растут в обычных условиях.

Лабораторные штаммы, адаптированные к питательным средам, образуют колонии через 24-48 часов (рисунок 55).

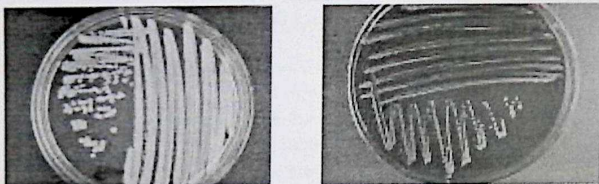


Рис.55. – Рост бруцелл на плотных питательных средах.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Для бруцелл характерен медленный рост, особенно в первых генерациях. На плотных питательных средах колонии бруцелл мелкие, круглые, выпуклые, гомогенные, в падающем свете – белесоватые, в проходящем – прозрачные с янтарным оттенком, иногда с нежной зернистостью в центре, с гладкой поверхностью (S-формы) или шероховатые (R-формы).

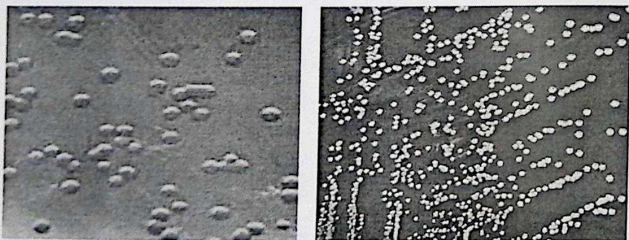


Рис.56. – Внешний вид колоний бруцелл на плотных питательных средах. Займствовано из Интернет-ресурсов

С возрастом нежные и прозрачные вначале колонии мутнеют, в бульонных средах образуют равномерное помутнение. Величина колоний может быть различной. Наряду с крупными, достигающими в диаметре 3-4 мм и больше, могут быть очень

мелкие – точечные колонии 0,05 – 0,1 мм. Различные факторы (рН питательной среды, влажность, наличие бактериофага в культуре и др.), влияющие на биологию культуры, могут привести также к изменению внешнего вида колоний (встречаются зернистые, стекловидные колонии, растущие в толще агара, эрозированные, сухие, слизистые, радиально исчерченные и др.).

Биохимические свойства

Для более точного установления биовара бруцелл FAO/WHO (1986) рекомендовано дополнительно проводить изучение окислительно-метаболической активности штаммов в отношении субстратов – *L*-аланин, *L*-аспарагин, *L*-глутаминовая кислота, *L*-аргинин, *L*-цитрулин, *DL*-орнитин, *L*-лизин, *D*-рибоза, *D*-ксилоза, *D*-галактоза, *D*-глюкоза, *i*-эритритол *B. melitensis*. [106].

Бруцеллы редуцируют нитраты в нитриты, обладают каталазной и оксидазной активностью, но *B. neotomae*, *B. ovis* и некоторые штаммы *B. abortus* оксидазонегативны. Бруцеллы не ферментируют углеводы в обычных условиях, не разжижают желатин, не свертывают молоко, не лизируют эритроциты, не образуют индол. Бруцеллы окисляют различные аминокислоты и углеводы, гидролизуют мочевины и редуцируют соли тетразолина в разной степени. Цитраты не используются бруцеллами как единственный источник углерода. В реакции Фогес-Проскауэра бруцеллы дают отрицательный результат. Реакция питательной среды при росте бруцелл остается либо нейтральной, либо изменяется в щелочную сторону.

Антигенная структура бруцелл

Как у других грамотрицательных бактерий, клеточная стенка бруцелл состоит из внутренней цитоплазматической мембраны, которая окружена пептидогликановым слоем, связанным с наружной мембраной, представляющей собой комплекс фосфолипидов, липополисахаридов и белков наружной мембраны. Пептидогликан бруцелл сходен с таковым у всех грамотрицательных микроорганизмов и включает глюкозамин, мураминую кислоту, аланин, глутаминовую кислоту, диаминопимелиновую кислоту.

Факторы патогенности бруцелл. Бруцеллы – факультативные внутриклеточные паразиты. Они живут и размножаются преимущественно внутри клеток ретикулоэндотелиальной системы зараженного организма. Патогенное действие бруцелл связано с

образованием следующих компонентов: 1. Микрокапсула. 2. Эндотоксин. 3. Ферменты агрессии: гиалуронидаза, нейраминидаза, каталаза, уреазы. 4. Белки наружной мембраны.

Бруцеллы обладают высокой инвазивностью (способны проникать через неповрежденные слизистые оболочки пищеварительного тракта, легких, глаз и кожу). При распаде бруцелл образуется эндотоксин, который обладает алергенными свойствами. Гиалуронидаза и нейраминидаза разрушают мукополисахаридный остов эпителиальных клеток и помогают возбудителю проникать через кожу и слизистые оболочки. Каталаза бруцелл внутри фагоцитов нейтрализует перекисные соединения, что препятствует разрушению возбудителя и способствует длительному сохранению бруцелл внутри клеток. Подавляют фагоцитоз также низкомолекулярные вещества, синтезируемые бруцеллами.

Патогенез бруцелллёза в полной мере обуславливает клиническое проявление болезни. Наибольшее значение в формировании комплекса клинических признаков при бруцелллёзе имеют следующие факторы: ситуационный иммунный статус хозяина, физиологическое состояние макроорганизма и его инфекционная чувствительность к различным по степени вирулентности видам бруцелл; массивность инфекта, повторность заражения; механизм инфицирования, ворота инфекции; иммунологическая реактивность и степень специфической сенсибилизации.

Бруцеллы проникают из внешней среды в организм через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, конъюнктиву, а также через поврежденную кожу. В течение первых 6-10 дней бруцеллы с током лимфы попадают в лимфоузлы, обуславливая скрытую форму болезни, затем в течение 10-15 дней локализуются в соответствующем лимфоузле (фаза регионарной инфекции). Через 20-30 дней, преодолев регионарный барьер, бруцеллы выходят из лимфоузла, и с током лимфы и крови распространяются по всему организму, обсеменяя все органы, и в случае беременности – плод. Воспалительные процессы развиваются в различных органах, клинически проявляясь артритом, маститом, эпидидимитом, бурситом, абсцессами и абортами.

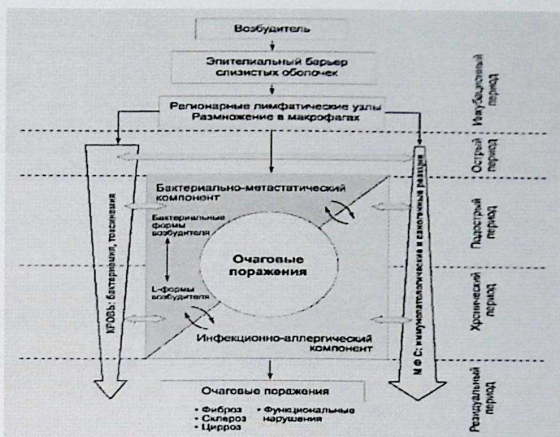


Рис. 57. Схема патогенеза и клинического проявления бруцеллёзной инфекции [по В.И. Покровскому и др., 2003]. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Диагностика. Учитывают эпизоотологические, клинические и патологоанатомические данные. Окончательная диагностика осуществляется на основании лабораторных исследований.

Во всех случаях аборта проводят бактериологическое исследование плода (желудок) и ставят биопробу. Основной метод прижизненной диагностики бруцеллеза – серологический (РА, РСК, РДСК, РБП – розбенгалпроба и КР с молоком). Кроме того, у овец, коз и свиней используют аллергическую пробу. Бактериологические исследования проводят в случае аборта или появления других признаков бруцеллеза. Диагноз считают установленным при положительных результатах бактериологического исследования и при сохранении у подозрительных по заболеванию животных реакций при повторных исследованиях.

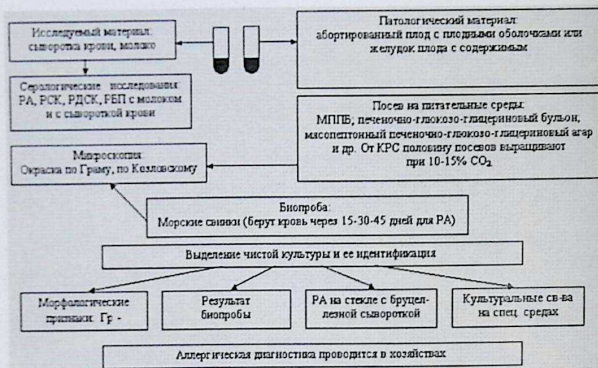


Рис. 58. Схема бактериологической диагностики бруцеллеза.
Займствовано из Интернет-ресурсов

При бактериологическом исследовании патологический материал (кровь в объеме 10 мл, суставная жидкость, костный мозг, конъюнктивальный секрет, моча и др.) засевают в 2 флакона с жидкой питательной средой (соевый бульон, бульон Мартена, эритроцит-бульон, бульон BBL, МПБ с 1% глюкозы и глицерина). В одном из флаконов создают повышенную концентрацию (10%) углекислого газа (флакон помещают в эксикатор со свечой для стимуляции роста *B. abortus*). Флаконы инкубируют в термостате при 37°C в течение 30 дней, после чего производят высевы на плотные среды (трипозный, 5%-ный кровяной, печеночный агар и др.). Для подавления посторонней микрофлоры в среды добавляют генцианвиолет, кристаллвиолет или антибиотики – полимиксин, амфотерицин, бацитрацин. В атмосфере углекислого газа рост бруцелл наблюдается уже через 4-5 суток. Посев крови на питательные среды положителен в 50-70% случаев у больных бруцеллезом. Колонии на плотной питательной среде имеют круглую форму, размеры от 1 до 5 мм в диаметре, серовато-белые, блестящие. Для дифференциации видов бруцелл используют показатели: - способность некоторых биоваров вырабатывать сероводород (*B. abortus*); - продукция уреазы; - чувствительность к

бактериостатическому действию красителей (основного фуксина и тионина).

Для микроскопического исследования мазки окрашивают по Граму, Стампу (модификация метода Циля-Нильсена), Козловскому или Шуляку-Шину (бруцеллы окрашиваются в красный цвет). Выделенную чистую культуру подвергают родовой идентификации и видовой дифференциации. *Родовая идентификация* включает изучение морфологии колоний, микроскопию препаратов, окрашенных по Граму или Козловскому, люминесцентную микроскопию и реакцию агглютинации на стекле со специфической бруцеллезной сывороткой. *Видовая дифференциация* бруцелл включает изучение зависимости от углекислоты, продукции сероводорода, устойчивости к фуксину и тионину, агглютинацию монорецепторными сыворотками, лизис специфическими бактериофагами.

Для выявления антигенов бруцелл применяют РПГА с эритроцитарным диагностикумом с антителами к родовому антигену.

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) используется для выявления бруцеллезных антител в сыворотке крови человека. Для постановки РПГА применяют бруцеллезный эритроцитарный антигенный диагностикум (рисунок 59).



Рис. 59 – Диагностикум эритроцитарный бруцеллезный антигенный жидкий. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для постановки реакций агглютинации Хеддельсона или Райта используют единый бруцеллезный диагностикум – диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации (рисунок 60).

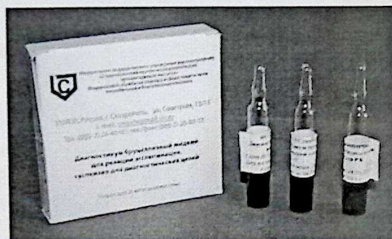


Рис. 60 – Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для выявления возбудителя в объектах внешней среды или в пищевых продуктах, а также при идентификации выделенных культур бруцелл применяют иммуноферментную тест-систему для определения бруцеллезного антигена (рисунок 61).

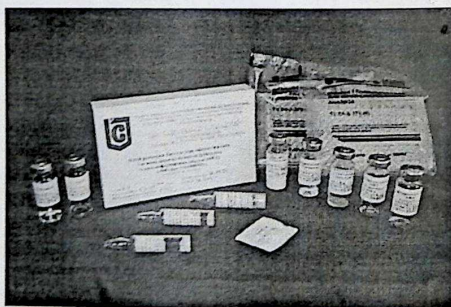


Рис. 61 – Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза с помощью иммуноферментного анализа. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Антиглобулиновая проба (реакция Кумбса) используется для диагностики хронических и латентных форм бруцеллеза, когда реакция агглютинации бывает отрицательной или положительной в низких титрах. Эта реакция позволяет выявлять неполные антитела с помощью антиглобулиновой сыворотки.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется для выявления ДНК бруцелл в различных материалах: в сыворотке крови, спинномозговой и синовиальной жидкостях. Эта реакция обнаруживает ДНК всех видов бруцелл, в том числе и вакцинных штаммов. Для проведения ПЦР выпускаются специальные тест-системы, в которые включены все необходимые ингредиенты. В основе метода лежит многократное копирование (амплификация) *in vitro* специфического фрагмента ДНК бруцелл. ПЦР позволяет выявлять наличие в исследуемом материале 100-1000 бактериальных клеток.

Дифференциальный диагност. Исключить кампилобактериоз, хламидиоз, инфекционный эпидидимит, лептоспироз, сальмонеллез, незаразные болезни с симптомами аборта.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей бруцеллеза.
2. Расскажите о таксономическом положении бруцелл.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства бруцелл.
4. Дайте характеристику культуральных свойств бруцелл.
6. Расскажите о биохимических особенностях бруцелл.
7. Какие антигены присущи бруцеллам?
8. Расскажите о резистентности бруцелл.
9. Расскажите о факторах патогенности бруцелл.
10. Охарактеризуйте фазы патогенеза бруцеллеза.
11. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики бруцеллеза.
12. Какие методы используются для диагностики бруцеллеза?
13. В чем заключается бактериологическая диагностика бруцеллеза?
14. Какие серологические реакции и с какой целью используются при диагностике бруцеллеза?
15. В чем заключается аллергическая проба, применяемая при

диагностике бруцеллеза?
16. Дифференциальный диагноз бруцеллеза.

18. Возбудители стафилококковых инфекций

Стафилококк – это вид бактерий, которые могут вызывать гнойно-септические процессы. Название стафилококков происходит от греческих слов “staphylos” – виноград, гроздь и “coccus” – ягода, зерно. Колония этих бактерий под микроскопом действительно напоминает виноградную гроздь.

История. Впервые обнаружен в 1880 году в шотландском городе Абердине Александром Огстоном в гное из хирургических абсцессов. Впервые стафилококки были описаны в 1878 году известным немецким микробиологом Робертом Кохом. В 1884 году описан Оттомаром Розенбахом. Розенбах идентифицировал золотистый стафилококк, выделив и отделив его от родственной бактерии *Staphylococcus albus*.

В 1899 году харьковский врач Павел Лашенков, исследуя причины массового отравления тортом местных гимназисток, открыл опаснейшие для человека свойства золотистого стафилококка — способность быстро размножаться при температурах выше 37°C, подавляя при этом бесцветный *S. albus*.

В начале 1930-х годов врачи начали использовать тест для обнаружения инфекции *S. aureus* с помощью теста на коагулазу — фермент, продуцируемый бактерией. До 1940-х годов инфекции, вызванные *S. aureus*, были смертельными для большинства пациентов. Однако врачи обнаружили, что использование пенициллина может вылечить инфекции *S. aureus*. К концу 1940-х годов устойчивость к пенициллину стала широко распространенной среди этой популяции бактерий, и начали происходить вспышки резистентного штамма.

Таксономическое положение и классификация стафилококков. Название стафилококков происходит от греческих слов “staphylos” – виноград, гроздь и “coccus” – ягода, зерно.

Стафилококки относятся к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семейству *Staphylococcaceae* и роду *Staphylococcus*. Этот род включает более 35 видов. Клинически значимыми для человека животных видами стафилококков являются *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

Staphylococcus saprophyticus, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intetrmedius* и некоторые другие.

Среди стафилококков выделяют патогенные виды (в частности, *S. aureus*), условно-патогенные виды (например, *S. epidermidis*) и непатогенные виды (в частности, *S. saprophyticus*). Важным патогенетическим признаком в классификации стафилококков является их способность продуцировать плазмокоагулазу. По признакам продуцировать плазмокоагулазу стафилококки подразделяются на коагулазоположительные или коагулазопозитивные (к ним относится золотистый стафилококк – *S. aureus*) и коагулазоотрицательные или коагулазонегативные стафилококки (к ним относятся эпидермальный и сапрофитный стафилококки – *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*). Внутри вида по чувствительности к бактериофагам *S. aureus* подразделяется на фагогруппы и фаговары.

Морфология. Стафилококки имеют шаровидную форму, диаметр клеток составляет 0,5-1,5 мкм. В мазках из культур, выросших на питательных средах, они образуют скопления, напоминающие виноградные грозди. Такое расположение обусловлено делением клеток в разных плоскостях (рисунок 62).

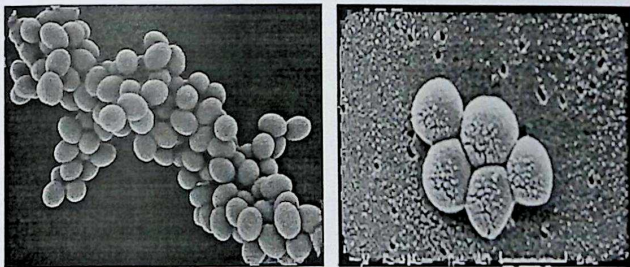


Рис. 62 – Морфология стафилококков. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Стафилококки неподвижны, спор не образуют. Некоторые стафилококки могут образовывать микрокапсулу. По Граму стафилококки окрашиваются положительно (рисунок 63).

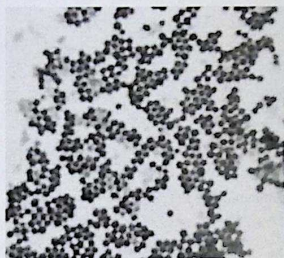
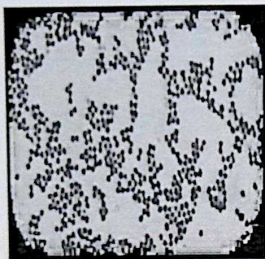


Рис.63. Стафилококки окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культуральные свойства стафилококков. Стафилококки являются факультативными анаэробами, хорошо растут в аэробных условиях при температуре 35-40°C и pH 7,0-7,5 на простых питательных средах (на мясо-пептонном агаре – МПА и в мясо-пептонном бульоне – МПБ). На МПА стафилококки образуют ровные круглые колонии S-формы диаметром 2-4 мм, которые могут быть окрашены в желтый, белый, оранжевый, кремовый цвета. Цвет колоний обусловлен наличием пигмента, синтезируемого стафилококками в аэробных условиях.

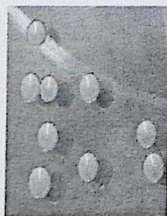
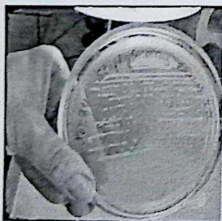


Рис. 64 – Колонии стафилококков на МПА (а), колонии S-формы золотистого стафилококка на МПА (б) равномерное помутнение в МПБ (в). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Однако пигментообразование не является видовым признаком стафилококков. Цвет колоний обусловлен наличием липохромного пигмента; его образование наиболее выражено на средах, содержащих кровь, углеводы или молоко. При

размножении в жидких питательных средах стафилококки вызывают равномерное помутнение (рисунок 64).

Стафилококки являются представителями галофильных (солеустойчивых) бактерий: они хорошо растут при высоких концентрациях в питательной среде хлорида натрия (10-15%). Поэтому селективными для стафилококков являются питательные среды с повышенным содержанием NaCl: желточно-солевой агар (ЖСА), молочно-солевой агар (МСА), молочно-желточно-солевой агар (МЖСА). На желточно-солевом агаре патогенные стафилококки формируют колонии, окруженные радужным венчиком за счет разложения лецитина яичного желтка с помощью фермента лецитиназы (рисунок 65).

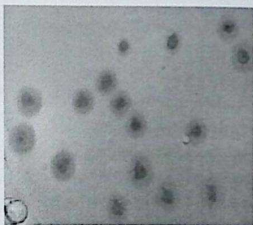
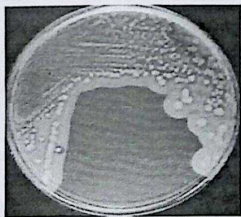


Рис.65 – Характер роста стафилококков на желточно-солевом агаре.
Заимствовано из Интернет-ресурсов

На кровяном агаре золотистый стафилококк формирует колонии, окруженные зоной гемолиза, эпидермальный стафилококк зон гемолиза не образует (рисунок 66).

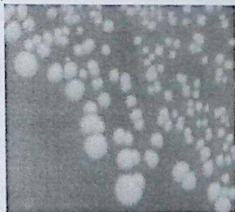
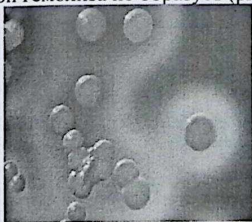


Рис.66 – Характер роста на кровяном агаре золотистого стафилококка (а) и эпидермального стафилококка (б).

Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства стафилококков.

Стафилококки обладают высокой биохимической активностью: они ферментируют в аэробных условиях многие углеводы до уксусной кислоты без газа. В частности, *S. aureus* разлагает до кислоты глюкозу, сахарозу, лактозу, маннит и не ферментирует мальтозу. Разные виды стафилококков ферментируют разный спектр углеводов. Дифференциально-диагностическое значение имеет тест на сбраживание глюкозы в анаэробных условиях. Ферментация глюкозы в анаэробных условиях с образованием молочной кислоты характерна для стафилококков и отличает их от стрептококков. Аэробные бактерии окисляют глюкозу, то есть образуют кислоту только в среде без вазелинового масла. Анаэробные бактерии ферментируют глюкозу, то есть образуют кислоту только в среде с вазелиновым маслом. Факультативные анаэробы, к которым относится золотистый стафилококк, утилизируют глюкозу в аэробных и анаэробных условиях.

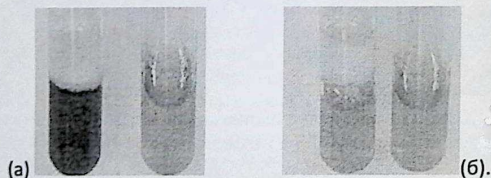


Рис. 67 – Окисление глюкозы аэробными бактериями (а) и сбраживание глюкозы факультативными анаэробами (б).
Займствовано из Интернет-ресурсов

Стафилококки разжижают желатин в виде воронки, белки расщепляют до аммиака и сероводорода, не образуют индола.

Патогенные виды стафилококков (в частности, *S. aureus*) продуцируют плазмокоагулазу (коагулазоположительные) и фибринолизин. *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* не продуцируют плазмокоагулазу (коагулазоотрицательные).

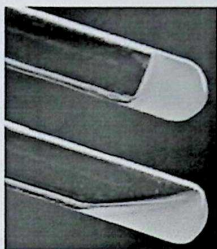


Рис. 68 – Свертывание плазмы коагулазой (верхняя пробирка) и разжижение сгустка фибринолизином (нижняя пробирка).
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Стафилококки продуцируют каталазу (каталазоположительные), что отличает их от стрептококков и энтерококков, которые являются каталазоотрицательными бактериями.



(a)



(б).

Рис. 69 – Выявление каталазы стафилококков с помощью перекиси водорода на питательном агаре (а) и на стекле (б). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Антигенными свойствами обладают пептидогликан, тейхоевые кислоты, белок А клеточной стенки, капсула стафилококков. Видоспецифическими антигенами для стафилококков являются тейхоевые кислоты: для *S. aureus* – рибитолтейхоевые, для *S. epidermidis* – глицеринтейхоевые, для *S. saprophyticus* – оба типа тейхоевых кислот.

Факторы патогенности стафилококков. В настоящее время у стафилококков выявлено большое количество факторов, участвующих в проявлении патогенных свойств возбудителя. Среди факторов патогенности стафилококков выделяют как структурные компоненты клеток (капсула, белки клеточной стенки), так и секретируемые субстанции (экзотоксины, экзоферменты). Каждый фактор патогенности выполняет специфическую функцию. Разные виды стафилококков обладают разным набором факторов патогенности.

Патогенез. Стафилококки способны поражать весь организм. При инфицировании могут развиваться как местные патологические процессы, так и системные поражения вплоть до сепсиса и септикопиемии. Проникновение патогена внутрь организма происходит при механическом повреждении кожного или эпителиального барьера, а также при закупорке выводных протоков желез кожи и волосяных фолликулов.

Инфекционный процесс начинается с адгезии стафилококка к молекулам клеточной поверхности или межклеточного матрикса. Адгезия протекает с помощью специфических молекул (адгезинов), входящих в состав клеточной стенки бактерий (белки, тейхоевые кислоты). **Рецепторы** – это комплементарные адгезинам структуры на поверхности эукариотической клетки и в межклеточном матриксе (фибриноген, фибронектин, ламинин, коллаген и др.).

После адгезии происходит **колонизация** тканей. После поражения наружных покровов стафилококки размножаются на месте внедрения, которое сопровождается воспалительным процессом. Одновременно происходит тромбоз прилегающих капилляров и отложение фибрина по периферии очага (формирование фиброзной капсулы). В центре очага клетки постепенно разрушаются, образуя характерный густой гной. Когда барьерные механизмы организма не в состоянии ограничить инфекцию входными воротами, происходит проникновение стафилококков в лимфу, а затем в кровяное русло и током крови разносится в другие органы и системы.

Диагностика. Основным методом диагностики стафилококковых инфекций является бактериологический.

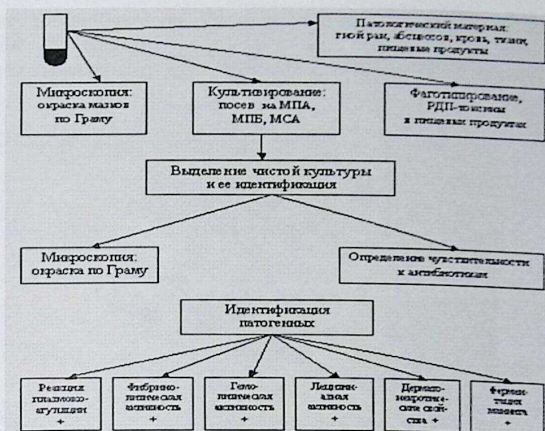


Рис. 70 – Схема лабораторно диагностики стафилококковых инфекций. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Бактериоскопический метод имеет ориентировочное значение, так как он позволяет обнаружить грамположительные кокки, расположенные скоплениями в виде виноградной грозди. В качестве исследуемого материала используют биоматериал (гной, отделяемое ран, слизь, кровь, мочу). Вид исследуемого материала зависит от локализации патологического процесса. Исследуемый материал засевают на ЖСА (молочно-желточный солевой агар) и кровяной агар. Получив чистую культуру, устанавливают родовую и видовую принадлежность возбудителя.

При необходимости проводят определение чувствительности стафилококков к антибиотикам и фаготипирование культур. Для выделения и количественного учета *S. aureus* в пищевых продуктах используют среду Байрда-Паркера.

Патогенные коагулазоположительные стафилококки (в частности, *S. aureus*) ферментируют маннит, а коагулазоотрицательные стафилококки не ферментируют маннит. Поэтому для выделения культур стафилококков из пищевых продуктов используют солевой агар с маннитом и феноловым

красным. Штаммы *S. aureus* на этой среде образуют желтые колонии и вызывают изменение цвета среды на желтый. Коагулазоотрицательные стафилококки образуют красные колонии без изменения цвета среды

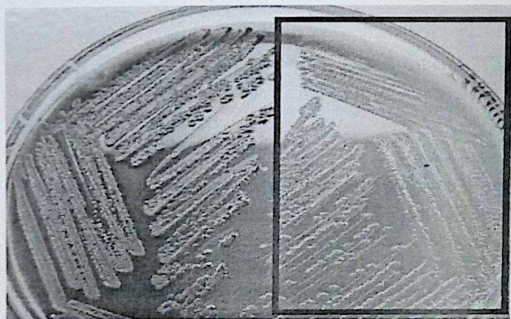


Рис. 71 – Рост коагулазоотрицательных (слева) и коагулазоположительных (справа) стафилококков на солевом агаре с маннитом. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рис. 72. Биохимическую активность стафилококков изучают с помощью коммерческих тест-систем Заимствовано из Интернет-ресурсов

Для изучения фагочувствительности стафилококков используют набор из 23 бактериофагов (рисунок 73).

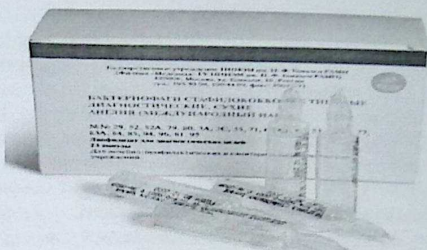


Рис. 73. Бактериофаги стафилококковые диагностические.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Чувствительность к антибиотикам проверяют стандартным диско- диффузионным методом.

Профилактика. Инфицированные коровы должны быть изолированы от других коров, чтобы предотвратить распространение инфекции. Это может быть самой важной профилактической практикой. Зараженные коровы должны быть помечены уникальными, видимыми опознавательными знаками, такими как специальные цветные ножные ленты или шейные цепи. Возможные средства изоляции коров:

- Не доите коров тем же самым аппаратом, который используется для доения коров, страдающих маститом.

- Выделяйте зараженных коров в одну группу и доите последними. Другой альтернативой является сортировка зараженных коров перед каждой дойкой и удержание их в изолированном загоне до тех пор, пока все остальные коровы не будут доены.

- После покупки животных, их следует изолировать до тех пор, пока не будут получены образцы молока и не будет определен статус возбудителя мастита.

- Проводите дезинфекцию доильных приспособлений после каждого доения инфицированных коров.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей стафилококковых

инфекций

2. Расскажите о таксономическом положении стафилококков.

3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства

стафилококков.

4. Дайте характеристику культуральных свойств стафилококков.

6. Расскажите о биохимических особенностях стафилококков.

7. Какие антигены присущи стафилококкам?

8. Расскажите о резистентности стафилококков.

9. Расскажите о факторах патогенности стафилококков.

10. Охарактеризуйте патогенез стафилококков.

11. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики стафилококков.

12. Какие методы используются для диагностики стафилококков?

13. В чем заключается бактериологическая диагностика стафилококков?

14. Профилактика стафилококков

19. Возбудители стрептококковых инфекций

Стрептококки вызывают многочисленные инфекционные болезни под общим названием стрептококкоз. Они имеют разнообразные формы проявления: пневмония, энтериты, маститы, метриты, эндометриты, артриты, фарингиты, эндокардиты, ишемию и септицемию и др.

История. Стрептококки впервые обнаружил при рожистом воспалении и раневых инфекциях немецкий хирург Т. Биллрот в 1874 г., а при септицемии и гнойных поражениях в 1878 г. французский микробиолог и химик Л. Пастер. Немецкий врач Ф. Фелсейзен в 1883 г. в лимфатических узлах и подкожной клетчатке обнаружил возбудителя рожистого воспаления.

Таксономическое положение и классификация стрептококков

Название стрептококков происходит от греческих слов *streptos* – цепочка, *kokkos* – зерно, ягода. Это название связано с расположением микробных клеток в виде цепочки. Такое расположение обусловлено делением клеток в одной плоскости.

Стрептококки относят к домену *Bacteria*, типу *Fermicutes*, классу *Bacilla*, порядку *Lactobacillates*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, который насчитывает 62 вида. Чаще всего инфекционную патологию у животных вызывают: *Str. eptococus pyogenes* – возбудитель различных нагноительных процессов; *Str. eptococus agalactiae* – возбудитель мастита коров; *Str. equi subsp. equi* – возбудитель мыта лошадей; *Str. pneumoniae* – возбудитель пневмококковой инфекции телят, поросят, ягнят, жеребят, козлят.

По характеру гемолиза стрептококки подразделяются на 3 группы: альфа-гемолитические, бета-гемолитические и негемолитические или гамма-стрептококки. В 1933 г. американский микробиолог Р. Лэнсфильд (рисунок 51) разделила β -гемолитические стрептококки по С-полисахаридному антигену (С-субстанции) на 20 серогрупп (А, В, С, D и т. д.).

Морфология. Стрептококки представляют собой грамположительные клетки сферической формы размером 0,5-2,0 мкм. Неподвижные, не образуют спор. Некоторые виды стрептококков формируют капсулу. Имеют пили (фимбрии). В мазках из агаровых культур стрептококки располагаются короткими цепочками, в препаратах из бульонных культур – длинными цепочками (рисунок 74).

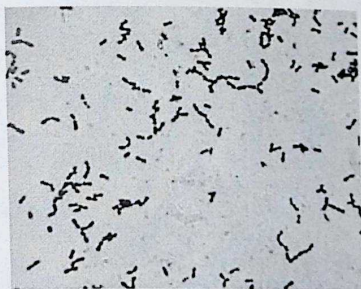


Рисунок 74 –Мазок окрашенные по Граму $\times 700$. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Клеточная стенка стрептококков имеет наружный белковый слой (содержит Т- и М-белки), средний полисахаридный слой

(состоит из N-ацетилглюкозамина и L-рамнозы) и внутренний слой (представлен пептидогликаном). Из клеточной стенки через гиалуроновую капсулу выступают фимбрии, содержащие М-белок и липотейхоевую кислоту.

Культуральные свойства стрептококков. Стрептококки являются факультативными анаэробами. Хорошо растут в аэробных условиях на питательных средах с кровью, сывороткой крови, асцитической жидкостью, глюкозой. На плотных средах образуют мелкие сероватые колонии. На обогащенном МПБ рост культуры, сопровождается диффузным помутнением питательной среды. Такой тип роста на сывороточно-глюкозном МПБ наблюдается у большинства изолятов. (рисунок 75).

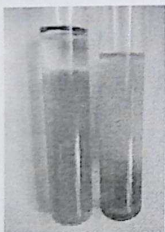


Рисунок 75 – Рост культуры на обогащённом МПБ

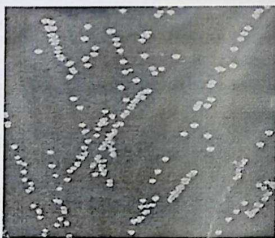


Рисунок 76 – Зона гемолиза на МПА, обогащённом кровью

По характеру роста на кровяном агаре выделяют три группы стрептококков:

- α -гемолитические стрептококки вызывают образование вокруг колоний зоны зеленоватого цвета, обусловленное превращением гемоглобина в метгемоглобин (условно-патогенные стрептококки, “зеленящие стрептококки” или стрептококки группы “*viridans*”, например, *S. mutans*) (рисунок 76);

- β -гемолитические стрептококки формируют колонии, окруженные зоной полного гемолиза (рисунок 77); к ним относятся патогенные стрептококки, основные возбудители гнойно-воспалительных заболеваний человека, например, *S. pyogenes*;



Рисунок 77 – Гемолиз эритроцитов β -гемолитическими стрептококками. Заимствовано из Интернет-ресурсов

- γ -стрептококки (негемолитические стрептококки) не образуют зоны гемолиза вокруг колоний (например, *S. mitis*).

Проявление гемолитической активности разных видов стрептококков хорошо иллюстрирует рисунок 78.

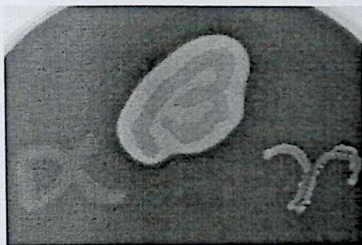


Рисунок 78 – Характер гемолиза у разных видов стрептококков. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства стрептококков

Стрептококки ферментируют углеводы и спирты: раффиноза, ксилоза, сахароза, галактоза, мальтоза, декстроза, глюкоза, маннит, дульцит, лактоза, арабиноза, инулин. с образованием кислоты без газа кроме дульцита и арабинозы, протеолитическими свойствами не обладают. Каталазоотрицательные. Сероводород не продуцирует, индола не образует.

Антигенная структура стрептококков. Стрептококки имеют групповой полисахаридный **С-антиген**, в зависимости от особенностей строения которого стрептококки разделены на серогруппы. С-антиген локализуется в клеточной стенке стрептококков. Некоторые виды стрептококков не имеют С-антигена.

В клеточной стенке стрептококков локализуется также белковый **М-антиген**. Он обладает типовой специфичностью. Структурно М-белок представляет филаменты (пили, фимбрии). По строению М-антигена стрептококки группы А подразделяются на серовары (более 100 сероваров).

Стрептококки имеют так называемые **перекрестно реагирующие антигены**. Антитела к таким антигенам взаимодействуют (перекрестно реагируют) с тканями миокарда, скелетных мышц, почек.

Факторы патогенности стрептококков. Наличие тех или иных факторов патогенности и их соотношение определяет различную вирулентность штаммов стрептококков.

Основные факторы патогенности стрептококков: М-протеин и М-подобные поверхностные протеины (Т-, R-белки), капсула, фибронектин связывающие белки (протеины F1, F2, Sfb1, Sfb2, SOF, PFBP, FbaA, FbaB), липотейхоевая кислота (LTA), стрептокиназа (фибринолизин), гиалуронидаза, пептидаза, ДНКаза (стрептодорназа), IgG-разрушающий фермент, стрептолизины О и S (гемолизины), стрептококковые пирогенные экзотоксины (streptococcal pyrogenic exotoxins, SPE) типов А, В и С, стрептоцины (бактериоцины). Факторы патогенности в сочетании с ферментами инвазии и агрессии обеспечивают паразитизм стрептококков в макроорганизме. Стрептококки могут довольно быстро менять свою патогенность, однако механизм изменчивости их патогенности до конца не расшифрован.

Патогенез. Стрептококки вызывают острые и хронические гнойно-воспалительные процессы в различных органах, в том числе сепсис и септикопиемию. Проникшие в организм стрептококки вначале адгезируются на эпителиальных клетках. В адгезии стрептококков принимают участие фимбриальный белок, фибронектинсвязывающие, коллагенсвязывающие, галактозосвязывающий, витронектинсвязывающий протеины, гиалуроновая капсула и другие адгезины. После адгезии

стрептококки колонизируют ткани. При этом некоторые факторы стрептококков (белок М, капсула) маскируют рецепторы для опсонинов и препятствуют фагоцитозу. Из входных ворот инфекции (местного очага) стрептококки могут распространяться лимфогенным и гематогенным путями по организму.

Бета-гемолитический стрептококк группы А, продуцируют эритрогенный токсин. Механизм передачи – аэрогенный, путь передачи – воздушно-капельный. Входными воротами инфекции служит слизистая оболочки. В месте входных ворот возбудитель размножается, продуцирует эритрогенный токсин и вызывает воспалительную реакцию.

Диагностика. Основным методом диагностики – бактериологический. Из выросших на кровяном агаре блестящих вязких колоний с зоной гемолиза делают мазки и окрашивают их по Граму. При наличии грамположительных стрептококков определяют каталазную активность бактерий. У стрептококков **каталазный тест** должен быть отрицательным.

Серогруппу выделенных стрептококков определяют с помощью реакции преципитации в геле или ИФА с группоспецифическими сыворотками. Серотип стрептококков определяют путем постановки реакции латекс-агглютинации с М-антисыворотками (рисунок 79).

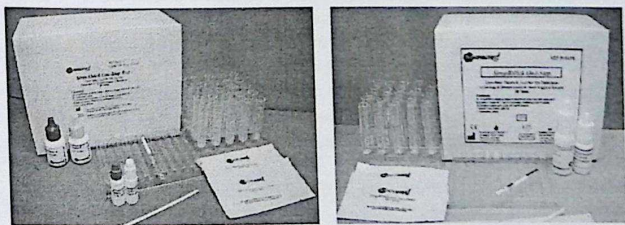


Рисунок 79 – Наборы для определения серогрупп стрептококков.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Система серологического М-типирования основана на использовании типоспецифических анти-М-сывороток в иммунологических реакциях (например, в реакции преципитации).

OF-типирование (opalescence factor – фактор опалесценции) основано на выявлении и идентификации липопротеиназы. Наличие OF-фактора определяется с помощью OF-типоспецифических сывороток. Существует множество вариантов OF-фактора. По этому фактору М-типы подразделяются на OF-положительные и OF-отрицательные.

Т- и tee-типирование предусматривает определение Т-типов стрептококков с помощью реакции агглютинации типоспецифическими Т-антисыворотками. Ген *tee*, кодирующий основную субъединицу Т-белка, идентифицируется молекулярными методами.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей стрептококковых инфекций
2. Расскажите о таксономическом положении стрептококков.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства стрептококков.
4. Дайте характеристику культуральных свойств стрептококков.
6. Расскажите о биохимических особенностях стрептококков.
7. Какие антигены присущи стрептококков?
8. Расскажите о резистентности стрептококков.
9. Расскажите о факторах патогенности стрептококков.
10. Охарактеризуйте патогенез стрептококков.
11. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики стрептококков.
12. Какие методы используются для диагностики стрептококков?
13. В чем заключается бактериологическая диагностика стрептококков?

20. Возбудители пастереллеза

Пастереллез – острое зоонозное инфекционное заболевание, относится к инфекциям с контактным механизмом передачи. К заболеванию восприимчивы все виды домашних животных и птицы. Наиболее чувствительны буйволы, крупный рогатый скот,

кролики и куры. Относительно высокая устойчивость у лошадей и плотоядных. Основным источником возбудителя инфекции служат больные и переболевшие животные.

История. Впервые возбудителя пастереллеза (холеры кур) в чистой культуре выделил Л. Пастер в 1880 г. В его честь возбудителя и назвали *Pasteurella*. Однако этому открытию предшествовали работы других ученых. В 1878 году О. Болингер изучал болезнь крупного рогатого скота, которая проходит с сильной инфильтрацией и множественными геморрагиями на серозных и слизистых оболочках различных органов. Позже было отмечено, что по ряду признаков заболевание, которое описал О. Болингер, имело много общего с холерой кур, а также энзоотической болезнью диких свиней. От крупного рогатого скота пастереллы были выделены Киттом в 1885 году, от буйволов – Орестом и Арман в 1887 году, от овец – Линьером в 1896 году, от свиней – Леффлером и Шютцем в 1885 году, от кроликов – Гаффки в 1883 году. На этом основании в 1886 году Ф. Хуппе объединил их под общим названием «гемморагическая септицемия». Луи Пастер также разработал активную специфическую профилактику.

Таким образом, в XIX веке многие ученые работали над изучением пастереллеза. Открытие Луи Пастером возбудителя этой болезни стало возможным благодаря работе целой плеяды талантливых ученых под руководством гениального ученого.

Таксономия. По современной классификации род *Pasteurella* представлен шестью видами: *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. gallinarum* и *P. urea*.

P. multocida является возбудителем геморрагической септицемии животных, холеры птиц, а также легочных пастереллезов, осложняющих респираторные инфекции вирусной и микоплазменной этиологии.

P. haemolytica вызывает пневмонии у крупного рогатого скота и овец всех возрастов.

P. pneumotropica является возбудителем энзоотического заболевания мышей, кроликов и лабораторных животных, которое проявляется поражением органов дыхания и образованием абсцессов.

P. aerogenes является постоянным обитателем кишечного тракта свиней.

P. gallinarum встречается как комменсал верхних дыхательных путей птиц, имеет низкую вирулентность и чаще обнаруживается в ассоциации с возбудителями других респираторных инфекций птиц, имеющих хроническое течение.

P. urea выделяют от людей при хроническом атрофическом насморке.

Ведущее этиологическое значение в патологии животных принадлежит двум пастереллам: *P. multocida*, серовары А, В, Ди *P. haemolytica*, биотип А

Морфология. Пастереллы в мазках из патологического материала представляют собой короткие (0,5-1,5 x 0,25-0,5 мкм), с закругленными концами овоидные палочки. В мазках из чистой культуры пастереллы более полиморфны: овоиды, мелкие кокки, палочки различной длины, которые иногда соединяются в небольшие нити. Хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красками. В мазках из культур, полученных на обычных питательных средах, биполярность не обнаруживается. Можно также применять негативный метод окраски. По Граму пастереллы окрашиваются отрицательно.

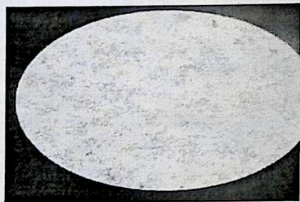


Рисунок 80 – *P. multocida* в препарате окраска по Граму

В мазках из органов павших животных или же из культур, выращенных на полужидких средах, окрашенных по Романовскому-Гимза отчетливо наблюдается биполярное окрашивание клеток. Мазки из патологического материала можно окрашивать также 0,5 — 1% спирто-водным или водным раствором метиленовой синьки или синькой Лефлёра в течение 5 минут с

последующей быстрой обработкой слабым раствором уксусной кислоты.

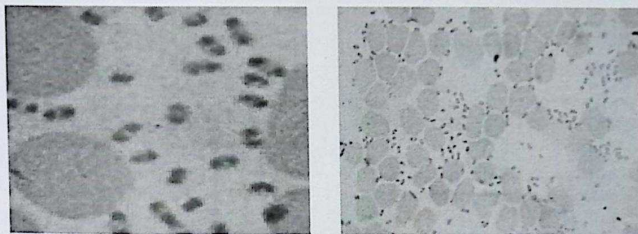


Рисунок 81. *P. multocida* в препарате при окраске по методу Романовского-Гимза. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культуральные свойства Пастерелла - факультативный аэроб, неподвижный, спор не образует, хорошо растет при температуре 36 — 38° на обычных питательных средах (рН 7,2 - 7,8). Рост на МПА - через 24 - 36 часов в виде мелких прозрачных колоний (росинчатость). По мере роста культуры колонии в сплошной налет беловато-серого оттенка.

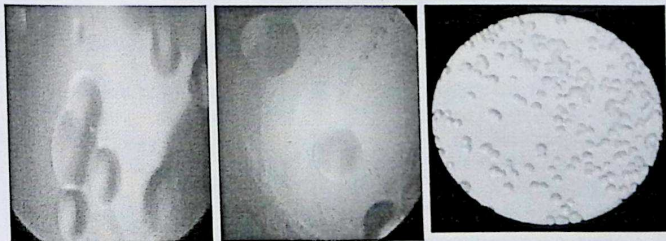


Рисунок 82. S-формы колонии *Pasteurella multocida* на МПА (x10)

На необогащенном МПА пастереллы растут в виде нежных мелких росинчатых колоний, слегка опалесцирующих в проходящем свете (рисунок 68). Для выделения чистых культур пастерелл производили дробный посев исследуемого

патологического материала на чашки Петри с обогащенными средами МПА (по две-три чашки на каждое исследование).

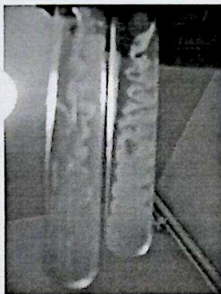


Рисунок 83 - Рост штамма *Pasteurella multocida* на МПА

На МПБ рост в виде равномерного помутнения; в дальнейшем образуется слизистого характера осадок, который при встряхивании старой культуры поднимается со дна пробирки в виде косы; пленка и пристеночное кольцо не образуются (рисунок 84).



Рисунок 84 - Рост штамма *Pasteurella multocida* на МПБ

На мясопептонной желатине по месту укола образует отдельные круглые колонии, которые в дальнейшем сливаются в

общий стержень беловатого цвета. На средах с сывороткой (МПА, МПБ) растет обильнее; на свернутой кровяной сыворотке образуются нежные колонии; разжижения сыворотки не наступает. На кровяном агаре гемолиза не вызывает. Установлено явление изменчивости культур возбудителя геморрагической септицемии. Описаны *гладкая (S)*, *мукоидная (M)* и *шероховатая (R)* формы роста. Культуры *гладкой формы* обладают характерными для данного возбудителя морфологическими, культуральными, вирулентными и другими свойствами. Культуры *шероховатой формы* отличаются от типичных непостоянством ферментативных свойств к ряду углеводов и многоатомных спиртов, в частности — разложением только в слабой степени глюкозы, а также отсутствием индолообразования. Кроме того, культуры шероховатой формы непатогенны и не обладают антигенными свойствами. На МПА культуры R-формы растут в виде шероховатых, с неровными, извилистыми краями и с возвышением в центре колоний (по Лихачеву). На МПБ подобная форма роста не вызывает помутнения среды, а через 24 часа образует плотный, трудно разбивающийся осадок.

Мукоидный (M) тип на МПА растет виде вязких, слизистого характера, больших с непрозрачным центром и просвечивающими краями колоний. Культуры типа M средней вирулентности.

Биохимические свойства. Биохимические свойства пастерелл выражены слабо. Штаммы обладают широкой вариабельностью. При изучении ферментативной активности рекомендуют использовать плотные питательные среды, позволяющие получить более стабильные результаты. Большинство штаммов дают положительные каталазный и оксидазный тесты. Они сбраживают без образования газа глюкозу, сахарозу, сорбит, маннит, не сбраживают лактозу и дульцит, образуют индол и сероводород, обладают орнитиндекарбоксилазной активностью, восстанавливают нитраты в нитриты, не ферментируют мочевины, не обладают гемолизирующей активностью, не разжижают желатин, не обладают коагулазной и фибринолитической активностью.

Антигенная структура. *P. multocida* в антигенном отношении неоднородна. По результатам реакции серозащиты различают 4 иммунологических типа — 1, 2, 3 и 4 (Робертс, 1947), что позволяет по капсульному антигену выделить, в РНГА 4 серологических типа

пастерелла — А, В, Д, Е и 12 *соматических типов антигена* (Картер, 1961).

- β -антиген — типоспецифический полисахарид, адсорбируется на эритроцитах в реакции не прямой гемагглютинации: встречается в микроорганизмах, которые дают флюоресцирующие и мукоидные варианты;

- d-комплекс — полисахаридно-белковый, тесно прикрепляющийся к клеточной стенке, иммуногенный, видимо, в некоторой степени лабильный;

- γ -антиген — липополисахарид, встречающийся у микроорганизмов всех вариантов, входящий в состав клеточной стенки; у каждого одна или более антигенных детерминант, ответственных за различные О-, или соматические, серовары. Определение антигенной структуры штаммов *P. multocida* играет большую роль при подборе вакцинных штаммов, в частности для приготовления вакцины против пастереллеза крупного рогатого скота — серотип В, птиц — А и D и свиней — А, В, D.

Факторы патогенности. У *Pasteurella multocida* обнаружено наличие трех основных факторов патогенности, ответственных за развитие инфекционного патологического процесса. Среди инвазивных факторов у *Pasteurella multocida* установлено наличие, двух основных ферментов: один из них гиалуронидаза, другой - нейраминидаза. Факторы патогенности с токсической функцией включают липополисахаридный комплекс клеточной стенки и экзотоксин белковой природы, выявленный в настоящее время у штаммов Д и А серовариантов *Pasteurella multocida*. Патогенные и вирулентные свойства различных серогрупп возбудителя колеблются в широких пределах. Наиболее выражены они по отношению к тому виду животных, от которых выделены. Группа Д — встречается у всех видов животных, группа А у птиц. В фильтратах старых бульонных культур обнаружен сильно ядовитый продукт (типа эндотоксина). Однако факторы патогенности *Pasteurella multocida* изучены еще недостаточно, особенно в плане иммуногенной активности.

Устойчивость во внешней среде невысокая. В почве выживают до 12 дней, в навозе - 15, в гниющих трупах - до 3 месяцев. При температуре 90° С пастереллы погибают за 10 мин, при кипячении - моментально.

Все известные дезинфицирующие вещества губительно действуют в течение несколько минут в обычных концентрациях.

Патогенез. В естественных условиях пастерелла чаще попадает в организм животных через дыхательные и пищеварительные пути, реже через кожные повреждения. Пастерелла размножается в местах внедрения, попадает в лимфу и кровь и в большинстве случаев вызывает септицемию и гибель животного через 12-36 ч. Генерализации процесса способствует подавление пастереллами процесса фагоцитоза (неполный фагоцитоз), выделение токсичных веществ, что приводит к массивному повреждению капилляров. В результате в подкожных и межмышечных тканях развиваются обширные отеки и геморрагический диатез. Чем выше вирулентность возбудителя, тем быстрее возникает септицемия. Если заболевание принимает затяжной характер, действие токсинов на ткани обуславливает развитие некротических процессов в различных органах и, в первую очередь в лёгких.

Диагностика. Диагноз пастереллеза ставится комплексно, с учетом данных эпизоотологии, клиники, данных патологоанатомических изменений и бактериологического исследования. Каждый из методов диагностики имеет ценность лишь в совокупности с другими методами, в особенности с результатами патологоморфологических и лабораторных исследований.

Для бактериологического исследования в лабораторию посылают отдельные органы. Выделение культуры пастерелл при бактериологическом исследовании без учета результатов, полученных другими диагностическими методами, также не дает оснований для постановки диагноза на это заболевание, так как при пастереллезе наблюдается широкое бактерионосительство как среди переболевших, так и среди клинически здоровых животных, контактировавших, а иногда и неконтактировавших с животными неблагополучных хозяйств.

Серологический диагноз при пастереллезе имеет меньшее значение, чем такие методы диагностики, как бактериологический и биологический, так как болезнь протекает быстро.

Для серологической диагностики используют реакции агглютинации, связывания комплемента, преципитации, гемагглютинации, адсорбции агглютининов и другие.

На сегодняшний день наиболее часто используемым диагностическим методом для диагностики пастереллеза является ИФА-диагностика. В настоящее время в России и Казахстане для исследований на пастереллез животных используется набор для

выявления антител к возбудителю пастереллеза (*Pasteurella multocida*) иммуноферментным методом фирмы «Synbiotics Europe» (Франция). В отличие от иммуноферментного анализа (ИФА), ПЦР-диагностика позволяет определять непосредственно возбудителя заболевания. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК.

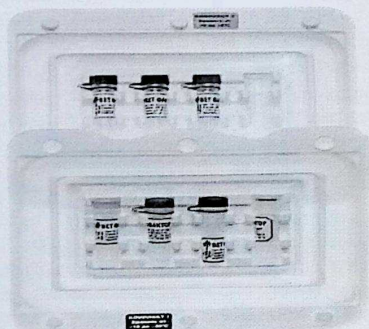


Рисунок 85 - ПЦР-ПАСТЕРЕЛЛЕЗ-ФАКТОР (кат. № D19319-VET) (55 реакций/110 реакций). Заимствовано из Интернет-ресурсов

Коммерческий набор предназначен для выявления ДНК *Pasteurella multocida* – возбудителя пастереллеза КРС, овец, свиней и птиц – в биологическом материале (кровь, сыворотка крови, фрагменты и суспензии паренхиматозных органов (легкие, селезенка и др.), лимфоузлы, молоко из пораженных долей вымени, смывы со слизистой оболочки носа) и кормах методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Дифференциальная диагностика. При постановке диагноза пастереллез необходимо дифференцировать от лихорадочных болезней септического характера, которые также сопровождаются появлением воспалительных отеков под кожей: сибирской язвы, эмфизематозного карбункула и злокачественного отека, классической чумы свиней, рожи.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей пастереллеза
2. Расскажите о таксономическом положении пастерелл
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства пастерелл.
4. Дайте характеристику культуральных свойств пастерелл.
6. Расскажите о биохимических особенностях пастерелл.
7. Какие антигены присущи пастереллам?
8. Расскажите о факторах патогенности пастерелл.
9. Охарактеризуйте патогенез пастереллеза
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики пастереллеза
11. Какие методы используются для диагностики пастереллеза?
12. Дифференциальная диагностика пастереллеза

21. Возбудители листериоза

Листериоз (лат., англ. — *Listeriosis*) — зоонозная болезнь животных и человека, характеризующаяся поражением центральной нервной системы, септическими явлениями, абортами, маститами или протекающая в форме бессимптомного носительства.

История. Впервые вспышки похожей на листериоз болезни описали в 1892г. Лусе и в 1911г. Хюльферс. Выделив от больных кроликов и морских свинок мелкую подвижную грамположительную бактерию. В 1927г. Пири выделил аналогичный микроорганизм от тушканчика и по его предложению в честь английского хирурга Дж. Листера назвал болезнь листериозом возбудитель — *L. monocytogenes*. В 1931—1936 гг. болезнь установлена у овец, домашних птиц, коров и свиней.

На сегодняшний день листериоз животных широко распространен и зарегистрирован в 60 странах мира. Экономический ущерб определяется высокой летальностью, снижением продуктивности животных, затратами на лечебно-профилактические и карантинно-ограничительные мероприятия.

Таксономия. По современной классификации листерии относятся к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, роду *Listeria*, который включает в себя шесть видов. Из шести известных видов этого рода *Listeria monocytogenes* заслуживает особого внимания, поскольку

является возбудителем заболеваний и человека, и животных; *Listeria ivanovii* патогенна только для животных, тогда как *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri* считаются безвредными бактериями.

Морфология. Листерии - мелкие грамположительные палочки правильной формы размером 0,5-2х0,4-0,5 мкм, обладающие полиморфностью. В мазках из чистой культуры располагаются под углом друг к другу, формируя структуры, напоминающие иероглифы или в виде римской цифры V. Спор, капсулу не образуют. В молодых 10-12-часовых культурах подвижны; факультативные аэробы. На твердых средах может происходить превращение типичных для листерии колоний S-форм в R-формы.

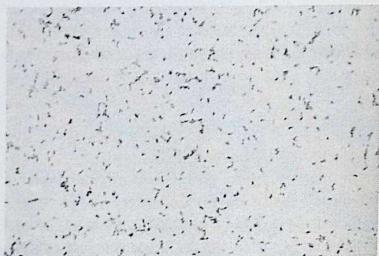


Рисунок 86. *L. monocytogenes* в препарате окраска по Граму.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Культуральные свойства. Являясь микроаэрофилами, хорошо растут на обычных питательных средах, на кровяном агаре в атмосфере 5% CO₂, образуя мелкие полупрозрачные колонии, окруженные зоной гемолиза. Температура культивирования 37С. Срок культивирования составляет 3-4 суток. На твердых питательных средах листерии S-формы дает мелкие (1-2 мм), гладкие, плоско-выпуклые, удлиненной или нитевидной формы колонии, полупрозрачные, голубовато-серые (в проходящем свете) и зеленые (при косом освещении). R-колонии характеризуются утолщенной зазубренным краем и грубозернистой массой, достигающей 1,5-3 мм. На хромогенном агаре Оттавиани-Агости *Listeria monocytogenes* дает зону гемолиза. При культивировании на жидких средах дает равномерное помутнение с последующим выпадением осадка. На

полужидких средах рост колоний (более обильный у поверхности) происходит по уколу. Культура имеет запахи творога или молочной сыворотки, что обусловлено накоплением продуктов углеводного обмена.

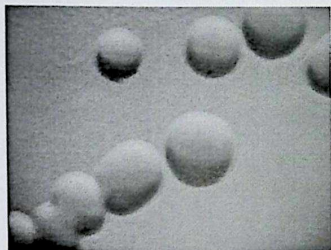


Рисунок 87 – Колонии листерий (S-форма). Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 88 – Колонии листерий R-форма. Заимствовано из Интернет-ресурсов

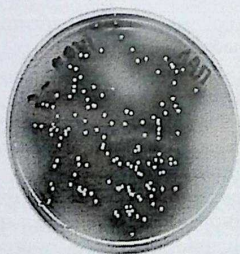


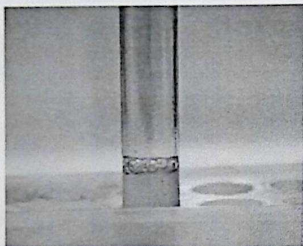
Рисунок 89. Рост *Listeria monocytogenes* на среде Palcam. Заимствовано из Интернет-ресурсов



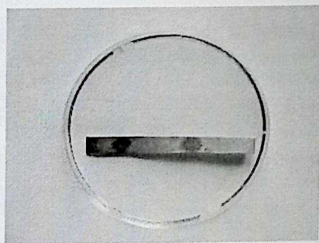
Рисунок 90. Рост *Listeria monocytogenes* на хромогенном агаре Оттавиани-Агости. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства. Листерии ферментируют глюкозу, левулезу, рамнозу, дисахариды (мальтозу), полисахариды (декстрин), гликозиды (салицин); к манниту, крахмалу, раффинозу,

инулину, мочеvine инертны. Тест на каталазу положительный, на оксидазу отрицательный. Содержат цитохромы и фаголизабелен. Сероводород и индол не продуцируют, желатин не разжижают.



Тест на каталазу *L. monocytogenes*



Тест на оксидазу *L. monocytogenes*

Рисунок 91. Каталазная и оксидазная активность *Listeria monocytogenes*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Антигенная структура. Листерии обладают О и Н антигенами. Установлено в структуре пяти термолabileльных жгутиковых (Н-) и четырнадцать термостабильных углеводных соматических антигенов (Аг) выделено 16 сероваров.

Факторы патогенности. Основной фактор патогенности листерий — эндотоксин. Другие факторы патогенности листерий: интерналин, листериолизин О, фосфолипазы.

- связанный с клеткой белок интерналин и внеклеточный главный белок обеспечивают проникновение в эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также поглощение микроба фагоцитами;

- листериолизин, являющийся ферментом металлопротеазой, разрушает мембраны фагосомы;

- поверхностный белок Act А, участвующий в полимеризации актина, обеспечивая передвижение бактерий по цитоплазме и проникновение бактерий в соседнюю клетку;

- фосфолипазы С разрушают клеточные мембраны, вызывая лизис фагосомы, способствуя репликации листерий в цитоплазме клетки хозяина и позволяя микробу распространяться по тканям организма;

- гемолизин вызывает гемолиз эритроцитов;
- лецитиназа обеспечивает выживание и размножение листерий в процессе внутриклеточной инфекции.

Устойчивость. Листерии длительно сохраняются во внешней среде, способны размножаться при низкой температуре, особенно в силосе. До 4 мес сохраняются в животноводческих помещениях, в сене, концентратах. При хранении в холодильнике при температуре 4 °С может происходить накопление листерии в продуктах питания (молоке, мясе, сыре). В прудовой воде при температуре 37 °С листерии сохраняются до 1 года. Листерии погибают под действием 5%-ного раствора лизола или креолина в течение 10 мин. Нагревание до 100 °С убивает листерии через 5 мин.

Патогенез. Попад в организм листерий, размножаются и распространяются по организму нейрогенными, лимфогенными и гематогенными путями. Листерий размножаются в месте первоначального внедрения, захватываются фагоцитирующими клетками, проникают в кровоток и распространяются по организму. Незавершенный фагоцитоз способствует переживанию возбудителя внутри фагоцитов и внутриклеточному размножению. Неблагоприятное воздействие на микроорганизм оказывают вырабатываемые листериями токсины. Возбудитель попадает в различные органы, в том числе в головной мозг. У взрослых животных листериозный сепсис возникает редко, чаще у них поражается центральная нервная система, а в период беременности — половая система; у молодняка развивается сепсис, а затем генерализованный гранулематоз.

Диагностика. Диагноз болезни устанавливают на основании комплекса эпизоотологических, патологоанатомических данных, а также результатов лабораторного исследования в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике листериоза.

Для исследования в лабораторию направляют трупы мелких животных или голову (головной мозг), кусочки печени, селезенки, почки, лимфатические узлы, пораженные участки легких, абортирванный плод и его оболочки, истечения из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени при маститах или при подозрении на скрытый мастит. Материал посылают свежий или консервированный в 30%-ном растворе глицерина. Для прижизненной диагностики для

серологического исследования посылают кровь или сыворотку крови от больных и подозрительных по заболеванию животных (желательно парные сыворотки, взятые с интервалом 7-14 дней).

Бактериологическая диагностика включает микроскопию исходного материала, посевы на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально-биохимическим, тинкториальным и серологическим свойствам, а также постановку биологической пробы на лабораторных животных. Решающее значение принадлежит выделению культуры. Причем, если культура листерии в бактериальной форме не выделена, но есть обоснованные подозрения на листериоз, проводят дополнительное исследование на обнаружение L-форм листерии. Для ускоренной диагностики листериоза можно применять прямую или непрямую реакцию иммунофлюоресценции (РИФ) и ИФА. Для идентификации используют также листериозные бактериофаги. Для выявления скрыто больных животных и листерионосителей проводят серологические исследования (РА и РСК, РНГА). При исследовании парных сывороток нарастание титра в 2-4 раза и более подтверждает диагноз на листериоз.

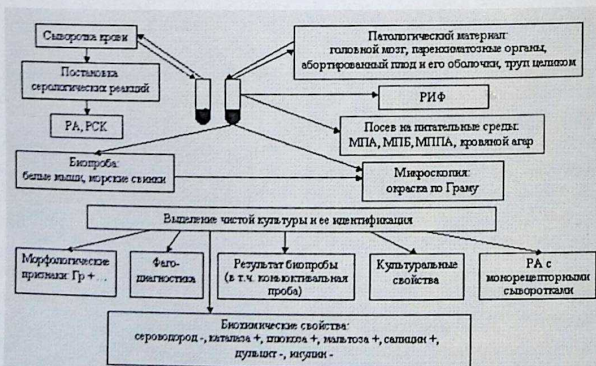


Рис. 92. Схема бактериологической диагностики листериоза.

Займствовано из Интернет-ресурсов

Дифференциальная диагностика. Листерия необходимо дифференцировать: у крупного рогатого скота от злокачественной катаральной горячки (ЗКГ), бруцеллеза, кампилобактериоза, трихомоноза; у свиней от болезни Ауески, отечной болезни; у овец от ценуроза; у всех животных от бешенства и кормовых отравлений.

При постановке диагноза на листериоз нужно помнить о возможности смешанной инфекции.

Контрольные вопросы:

1. История открытия возбудителей листериоза
2. Расскажите о таксономическом положении листерии
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства листерии.
4. Дайте характеристику культуральных свойств листерии.
6. Расскажите о биохимических особенностях листерии.
7. Какие антигены присущи листериям?
8. Устойчивость листерии
9. Расскажите о факторах патогенности листерии.
10. Охарактеризуйте патогенез листериоза
11. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики листериоза
12. Какие методы используются для диагностики листериоза?
13. Дифференциальная диагностика листериоза

22. Возбудители лептоспироза

Лептоспироз (лат., англ. — Leptospirosis; болезнь Вейля, тиф собак) — в основном остро протекающая природно-очаговая болезнь животных многих видов и человека, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, ге-моглобинурией или гематурией, геморрагиями, желтушным окрашиванием и очаговыми некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта, абортами, маститами, рождением нежизнеспособного потомства, периодической офтальмией и менингоэнцефалитами, снижением продуктивности животных.

История. Впервые лептоспироз как самостоятельную болезнь у человека описали в Германии А. Вейль (1886) и в России Н. П.

Васильев (1888). Возбудителя болезни (*L. ictero-haemorrhagiae*) открыли в Японии Р. Инада и соавт. в 1914 г. В последующие годы в разных регионах земного шара были установлены и описаны многочисленные серологические группы и варианты возбудителей лептоспироза человека и животных разных видов.

Болезнь встречается во всех странах мира, поражая значительные группы людей, сотни и тысячи голов сельскохозяйственных животных. По опасности, эпидемиологической значимости и экономическому ущербу лептоспироз не уступает туберкулезу и бруцеллезу.

Таксономия. Возбудитель лептоспироза относится к отделу *Gracilicutes*, семейству *Leptospiraceae*, роду *Leptospira*. На данный момент насчитывается 9 патогенных видов, 5 условно-патогенных и 7 сапрофитных видов, образующих три филогенетические подгруппы.

Критерием для классификации патогенных лептоспир служит их антигенный состав. Идентифицировано более 250 сероваров патогенных лептоспир, объединенных на основании антигенного родства в 24 серологические группы. Наиболее часто встречаются следующие: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Hardjo*, *Tarassovi*.

Морфология и тинкториальные свойства. Лептоспиры – бактерии, имеющие извитую форму, длиной 7-14 мкм, толщиной 0,1 мкм; характеризуются наличием многочисленных мелких завитков, концы лептоспир загнуты в виде крючков. Не образуют спор и капсул; подвижны – совершают поступательное, вращательное, сгибательное движения. Лептоспиры анилиновыми красителями красятся плохо, по Романовскому-Гимзе окрашиваются в розовый цвет, грамотрицательны. Оптимальный способ изучения их морфологии – темнопольная микроскопия.

Патогенные штаммы лептоспир, изолированные из хозяев, как правило, короче и имеют меньший шаг спирали, чем сапрофитные формы и многократно пересеянные лабораторные штаммы. Лептоспиры, культивируемые в лабораторных условиях в средах с недостатком питательных веществ удлиняются и поддержание культур в таких средах приводит к появлению неподвижных сферически форм (Ellis et al., 1983).

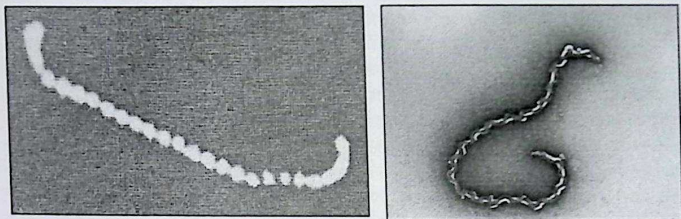


Рис.93. Электронная микрофотография клеток *Leptospira interrogans*. Заимствовано из Интернет-ресурсов

При микроскопировании гистологических препаратов из органов павших животных, окрашенных по методу Леватици (метод серебрения), лептоспиры окрашены в черный цвет.

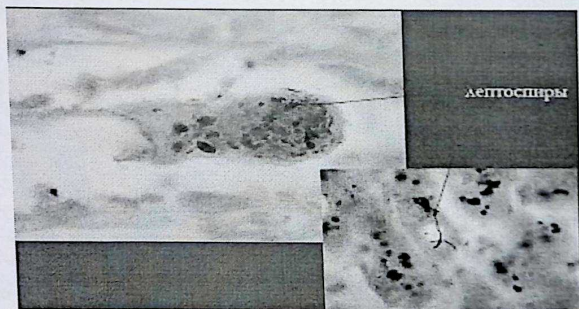


Рис.94. *Leptospira interrogans* в гистопрепарате, окрашенном методом серебрения по Леватици

Культуральные свойства. Патогенные лептоспиры являются аэробными (часто микроаэрофильными) спирохетами. При хорошей аэрации, pH 7,2-7,4 и оптимальных условиях инкубирования (температуре 28-30°C для большей части сероваров и 30-32°C для *L.canicola*) они культивируются намного лучше, чем другие спирохеты. Границы температуры инкубации посевов, в пределах которых возможен рост лептоспир, составляют 22-37°C. Для нормального роста они нуждаются в липидах и ненасыщенных

жирных кислотах, а также витаминах В1 и В12. Наличие белка в питательной среде для лептоспир не обязательно. Из числа аминокислот только аспарагин оказывает на них стимулирующее действие. Наиболее интенсивно лептоспиры растут на жидких и полужидких питательных средах с 5-10% сыворотки крови кролика или барана (вместо сыворотки часто применяют сывороточный альбумин). Время развития одной генерации лептоспир в логарифмической фазе составляет 58-68 ч, поэтому максимальный рост наблюдают на 5-10 день. На жидких средах эти лептоспиры растут медленно.

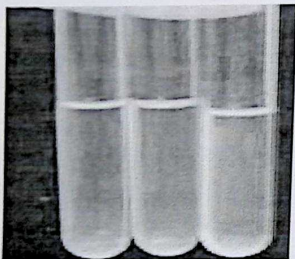


Рис.95. Рост *Leptospira interrogans* на жидкой питательной среде.
Займствовано из Интернет-ресурсов

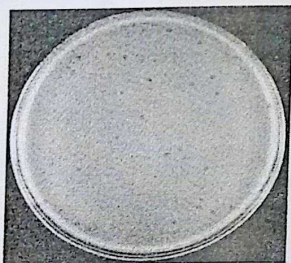


Рис.96. Рост *Leptospira interrogans* на среде с агаром Дифко.
Займствовано из Интернет-ресурсов

При микроскопировании препаратов культур в одном поле зрения (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$) обычно обнаруживают около 100 подвижных бактерий. Культуры лептоспир в жидких средах бесцветны, не имеют запаха, при бурном росте опалесцируют. Опалесценция лучше видна в проходящем свете при легком встряхивании пробирки. В полужидких средах на 1,5-2 см ниже поверхности появляется помутнение в виде кольца, интенсивность которого усиливается по мере роста лептоспир. В средах с 1% агара эти бактерии формируют преимущественно заглубленные колонии, контуры которых могут быть четкими или размытыми. Тенденция к заглубленному росту (феномен Дингера), обеспечивающая некоторое ограничение доступа кислорода, свидетельствует о

микроаэрофильности лептоспир. В средах с 2% агара лептоспиры образуют поверхностные колонии, имеющие разную степень прозрачности вплоть до трудно различимых при обычном освещении. В процессе хранения музейных штаммов ЛС их пересевают не реже 1 раза в месяц. Для длительного хранения культуры заливают слоем стерильного вазелинового масла или запаивают в ампулы, что предупреждает испарение среды и изменение ее pH. Патогенные лептоспиры в процессе культивирования постепенно утрачивают свою вирулентность. Восстановление удастся посредством заражения чувствительных животных (молодых морских свинок).

Биохимические свойства. Биохимическая активность лептоспир невысокая. Лептоспиры - хемоорганотрофы с дыхательным типом метаболизма. Они оксидазонегативны, но каталазо- и/или пероксидазопозитивны. Способны утилизировать азот из мочевины, креатинина и саркозина, что протекает под контролем ферментов микроорганизмов - аланин дегидрогеназы, глутамат дегидрогеназы и глутамат пируват трансминазы.

Антигенная структура. Антигенный состав лептоспир сложен. Наиболее важными антигенами являются протеины и липополисахариды наружной оболочки, жгутика, а также экскреторные антигены. Несмотря на своеобразное положение жгутиков (в периплазматическом пространстве между наружной и внутренними мембранами), их антигены высокоиммуногенны. Родоспецифическим является полисахаридный фибриллярный антиген, принадлежность к группе и варианту определяется соответственно оболочечными белковыми и липопротеиновыми антигенами.

Факторы патогенности. Патогенные свойства лептоспир обусловлены образованием малоизученных экзотоксиноподобных веществ и эндотоксинов. Лептоспиры, кроме того, продуцируют фибринолизин и плазмокоагулазу.

Резистентность. Лептоспиры очень быстро погибают при действии высоких температур, дезинфицирующих средств, но достаточно устойчивы к низким температурам. В воде естественных водоемов сохраняют жизнеспособность в течение 5-10 дней, в сырой почве - до 270 дней.

Патогенез. Входные ворота инфекции - слизистые оболочки ротовой полости, глаз, носа, кожа. Лептоспиры распространяются по лимфатическим путям, проникают в кровь и током крови разносятся

по организму, попадая в различные органы – печень, почки, легкие и т.д. В органах микроорганизмы интенсивно размножаются, затем вновь поступают в кровь. В результате действия возбудителей и их токсинов повреждается стенка кровеносных капилляров и наблюдаются кровоизлияния в различные органы и ткани. Больше всего страдают печень, почки, надпочечники, сердце, мышцы.

Диагностика. Прижизненный диагноз на лептоспироз ставят комплексно с использованием эпизоотологических и клинических исследований, обнаружения возбудителя посредством микроскопии мазков крови или мочи в темном поле, а также на основании установления высокого титра специфических антител или сероконверсии.

Постмортально обнаружить и изолировать возбудителя удастся из различного биоматериала, но предпочтение отдается почкам, печени, селезенке и лимфатическим узлам. В практику лабораторной диагностики лептоспироза в медицине и ветеринарии все шире внедряются новые методы обнаружения лептоспир. К их числу относятся иммунохимические (РИФ, иммунофосфатазный и иммунопероксидазный тесты, иммунологическое окрашивание золотом), электронная микроскопия, ПЦР и ДНК-зондирование.

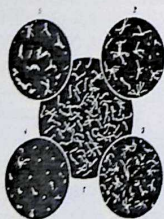


Рис.97.Реакция
агглютинации-лизиса.
Обозначения: 1 -
отрицательная реакция;
2-5 - положительная
реакция: различная
степень агглютинации и
лизиса.



Рис. 98.
Положительная
реакция



Рис.99.
Отрицательная
реакция

Но наиболее широко используют серологический метод (РСК, РНГА, РА, реакция лизиса); по нарастанию титра антител судят о наличии заболевания.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей лептоспироза.
2. Расскажите о таксономическом положении возбудителей лептоспироза.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства лептоспир.
4. Дайте характеристику культуральны свойств лептоспир.
6. Расскажите о биохимических особенностях лептоспир.
7. Какие антигены определяют специфичность лептоспир?
8. Расскажите о резистентности лептоспир.
9. Расскажите о факторах патогенности лептоспир.
10. Охарактеризуйте патогенез лептоспироза.
11. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики лептоспироза.
12. Какие методы используются для диагностики лептоспироза?
13. В чем заключается бактериологическая диагностика лептоспир? Какие среды используются для выделения и культивирования лептоспир?

23. Возбудители анаэробных инфекций животных

Клостридии - это род микроорганизмов - *Clostridium*, объединяющие все болезни теплокровных животных, вызываемых различными видами анаэробных спорообразующих бактерий.

История. Впервые раневую гангрену описал французский хирург А. Паре. Французский врач А. Вельпо в 1839 г. опубликовал свои наблюдения над подобным заболеванием, названном им "травматическая эмфизема". Полное описание клинической картины анаэробной раневой инфекции дал российский врач Н.И. Пирогов во время Севастопольской и Кавказской военных кампаний. В 1861 г. Л. Пастер описал одного из возбудителей анаэробной инфекции - *Vibrio septique*

(септический вибрион), получавшего в последующем название *Clostridium septicum*. В 1892 г. американские ученые У. Г. Уэлч и Г. Неттал выделили и описали *Clostridium perfringens*. В 1894 г. Ф. Нови подробно охарактеризовал возбудителя, получившего имя исследователя (*Clostridium novyi*).

М.В. Вейнберг и П. Сеген (P. Sequin) в 1915-1917 г. выделили от больных газовой гангреной людей несколько возбудителей: *Clostridium fallax*, “бациллу злокачественного отека” *Clostridium oedematiens* и “растворяющую ткань” бациллу *Clostridium histolyticum*. В 1922 г. аргентинский микробиолог А. Сорделли от больного газовой гангреной человека выделил еще одного возбудителя этого заболевания - *Clostridium sordellii*.

Токсономия. Род клостридий многочислен и разнообразен. В настоящее время насчитывается около 220 видов клостридий, большинство из которых является сапрофитами. Клостридии относятся к роду *Clostridium*, семейству *Clostridiaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, отделу *Fermicutes*. Согласно классификации Берджи, род разделен на пять групп, сформированных по способности видов ферментировать желатин и расположению спор в клетке (центрально, терминально или субтерминально). В первую группу входят не разжижающие желатин клостридии, споры которых расположены субтерминально. Типичные представители этой группы - *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. fallax*.

Во вторую группу входят виды *Clostridium* также с субтерминальным расположением спор, но разжижающие желатин. В этой группе находятся большинство патогенных видов: *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* (*C. oedematiens*). Эти бактерии образуют специфические для каждого вида экзотоксины высокой активности, к которым чувствительны многие виды животных. Так же в группе насчитывается значительное количество непатогенных видов.

В третью и четвертую группы входят клостридии, у которых споры расположены терминально, но представители третьей группы не разжижают желатин, а четвертой разжижают. Единственным патогенным видом в этих группах является возбудитель столбняка *C. tetani*.

К пятой группе относятся пять видов клостридий (*C. acidurici*, *C. kluyveri*, *C. malacosomae*, *C. brevifaciens*, *C. thermocellum*),

которые растут на питательных средах только с дополнительными ростовыми добавками, например, мочевой кислотой, дрожжевым экстрактом, этанолом, при повышенной щелочности среды (рН 8,5-10,2) и др. Все они сапрофиты. По антигенной структуре внутри видов выделяют серовары (серотипы), а внутри серотипов — подтипы. В частности у *C. perfringens* различают 6 серотипов (А, В, С, D, Е, F), у *C. novyi* — 4 серотипа (А, В, С, D). Основными факторами патогенности клостридий являются экзотоксины и ферменты агрессии. Разные виды клостридий синтезируют разный набор экзотоксинов. Эти экзотоксины обладают гемолитическим, некротизирующим, летальным действием. Ферменты агрессии (лецитиназа, ДНК-аза, гиалуронидаза) вызывают распад тканей

C. perfringens. является основным возбудителем газовой гангрены (примерно 90%).

История открытия. Первое полное описание этого заболевания принадлежит знаменитому русскому хирургу Пирогову и французу Мезоневу (Mesonneuve). Согласно данным Кенена (Соепен), Горовиц и др., газовая гангрена была известна в глубокой древности и в средние века, но как отдельное заболевание она не была описана. Только в 1853 г. Мезонев это заболевание выделяет в отдельную форму, дав ему меткое название «молниеносная гангрена («gangrene foudroyante») — название, не только сохранившееся до последнего времени, но и послужившее основанием для другого распространенного определения — «газовая гангрена» («gangrene gazeuse»).

Морфология. Бактерии данного вида представляют собой крупные толстые палочки размером 1,0-1,5х4,0-8,0 мкм, расположенные изолированно или парами, реже короткими цепочками, неподвижные. Молодые культуры окрашиваются по Граму положительно, старые отрицательно, образуют овальные или сферические споры, облигатные анаэробы, каталазоотрицательные и лецитиназаположительные бактерии.

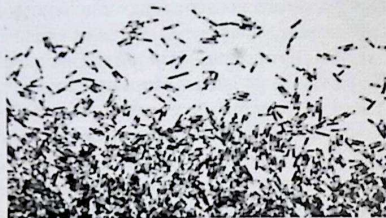


Рисунок 100. *C. perfringens* окрашено по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 101. Капсулы вокруг клеток *Clostridium perfringens*. Увел. X 2200. Заимствовано из Интернет-ресурсов

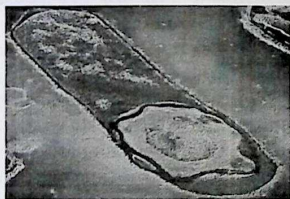


Рисунок 102. *C. perfringens* типа А-клетки со спорой субтерминально. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. Культуры хорошо растут на питательных средах при наличии невысокого уровня анаэробноз (40 мм.рт. ст), при этом на поверхности агар образуют несколько вариантов колоний, как правило, гладкие, шероховатые или слизистые. На кровяномагаре с глюкозой *C. perfringens* образуют очень мелкие сероватые или желтоватые мутные колонии с зоной гемолиза различной ширины. Культуры хорошо растут при температуре 35 - 37°C, но могут расти и при 42°C, что является дифференцирующим экспресс-тестом. При посеве на МППБ или лакмусовое молоко при 42°C, рост и газообразование наблюдаются уже через 3 ч, так как другие клостридии вырастают только через 8-16 часов и более.

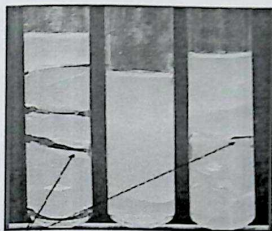


Рисунок 103 *C. perfringens* разрывают агар в результате мощного газообразования. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

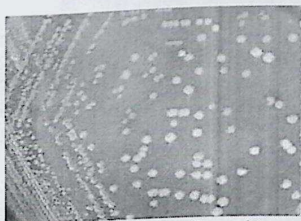


Рисунок 104 – Рост *C. perfringens* на МПА. Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рисунок 105 – Рост *C. perfringens* на кровяном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

На среде Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар для патогенных анаэробов) в процессе роста клостридий сернистый натрий восстанавливается с образованием сернистого железа. На этой среде *C. perfringens* образуют черные колонии.

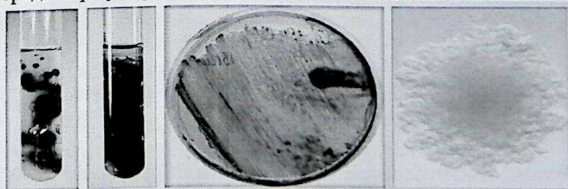


Рисунок 106 – Характер роста *C. perfringens* на сульфитном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

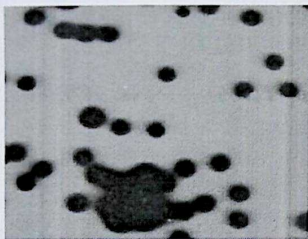


Рисунок 107 - Рост *C. perfringens* на среде Вильсона-Блера.
Займствовано из Интернет-ресурсов.

При росте на жидких питательных средах (МППБ, Китта-Тароцци и др.) вызывают интенсивное помутнение среды с обильным газообразованием. После окончания роста происходит выпадение культуры в осадок с полным просветлением среды. В молоке рост клостридий сопровождается створаживанием молока и образованием губкообразного сгустка - "штормовая реакция".

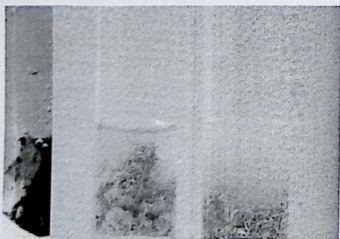


Рис.108. – Рост *C. perfringens* на среде Китта-Тароцци.
Займствовано из Интернет-ресурсов.



Рис.109.—Образование губкообразного сгустка при росте *C. perfringens* в молоке.
Займствовано из Интернет-ресурсов.

Биохимические свойства. Обладая высокой ферментативной активностью, образуют кислоту и газ из глюкозы, фруктозы, галактозы, мальтозы, лактозы, крахмала, гликогена и инозита. Встречаются штаммы, ферментирующие салицин. Лакмусовое молоко, при посеве достаточно большой дозы возбудителя,

свертывается быстро с образованием кислоты, сгусток не переваривается. Индол не образуют, свернутую сыворотку крови и альбумин не разжижают, в мозговой среде не вызывают почернения, в бульоне с кусочком мяса происходит окраска мяса в красный цвет. Желатин в процессе роста разжижают и вызывают его потемнение. Высокая ферментативная активность, быстрый рост и интенсивное газообразование при росте на плотных питательных средах вызывают разрывы агара.

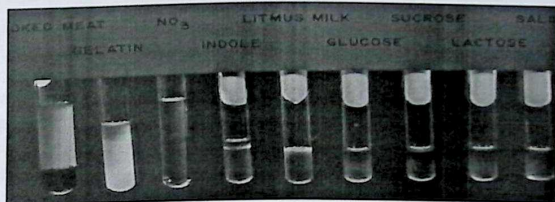


Рисунок 110— Биохимические свойства *C. perfringens*.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Антигенная структура. Выделяют 6 сероваров (A-F) *clostridium perfringens*, различающихся по антигенным свойствам продуцируемых экзотоксинов. По спектру продуцируемых токсинов вид *C. perfringens* разделен на пять типов – A, B, C, D, E, F, патогенные свойства которых различны. Так *C. perfringens* тип A вызывает пищевые отравления у человека и животных, газовую гангрену, в том числе некротизирующие энтериты и маститы у крупного рогатого скота, энтериты у собак, некротизирующий энтерит кур. *C. perfringens* тип B является возбудителем дизентерии ягнят и жеребят, энтеротоксемии молодняка различных видов животных. *C. perfringens* тип C вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец и поросят, телят, жеребят; некротический энтерит цыплят; *C. perfringens* тип D – энтеротоксемию овец («мягкая почка»), коз, телят; *C. perfringens* тип E – энтеротоксемию овец и телят.

Факторы патогенности. *Clostridium perfringens*. По способности образовывать 4 главных токсина (α - β , ϵ -и ι) *C.perfringens* разделяют на 6 сероваров –A, B, C, D, E, F. При

некротических энтероколитах иногда выделяют микроорганизмы типов С и F; возбудители типа В вызывают инфекционные энтеротоксемии (пищевые токсикоинфекции). Но первое место по частоте встречаемости в объектах окружающей среды и тяжести болезни занимает *C. perfringens* типа А (*C. welchii*).

Альфа(α)-токсин (фосфолипаза С)—продуцируют все серотипы *C. perfringens*, является основным фактором патогенности всех возбудителей газовой гангрены. **α-токсин** являясь цитотоксином, обладает лецитиназной активностью.

Тета(θ)-токсин—перфринголизин, **каппа(κ)-токсин**—коллагеназа, **ми(μ)-токсин**—гиалуронидаза, **ни(ν)-токсин**—ДНК-аза и др. в отдельности не оказывают действия, только усиливают действие α-токсина.

C. perfringens серотипа А образуют энтеротоксин, вызывающий пищевые токсикоинфекции.

Патогенез. Таков же патогенез инфекции и в тканях организма-хозяина: интенсивное газообразование создает очаг повышенного давления, сдавливаются кровеносные сосуды, без поступления крови происходит омертвление тканей и быстрый рост культуры клостридий. Образующиеся токсины впитываются из очага некроза и разносятся по организму, вызывая нарастание общего токсикоза и коматозное состояние. Токсины, продуцируемые клостридиями, имеют в основном белковую структуру, и изучению их антигенной структуры посвящено большое количество работ.

Диагностика.

Материалы для исследования: кусочки пораженной ткани, экссудат, гной, раневое отделяемое.

Микроскопический метод. Обнаружение в мазке крупных грамположительных палочек, окрашенных по Граму—диагностический признак возбудителя.

Бактериологический метод. Посев исследуемого материала на тиогликолевую среду, среду Китта-Тароцци, кровяной агар для выделения чистой культуры и идентификации возбудителя

Для идентификации *C. perfringens* проводят инокуляцию в молоко. Бактерии створаживают молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка в течение 3 часов. **Тест Неглера**—при температуре 35°C в анаэробных условиях

лецитиназаположительные бактерии образуют непрозрачные поля вокруг штрихов

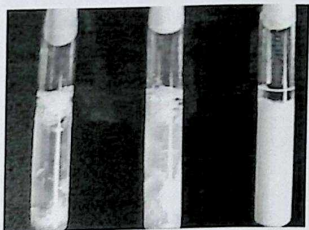


Рисунок 111. *C.perfringens* створаживает молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка. Заимствовано из Интернет-ресурсов

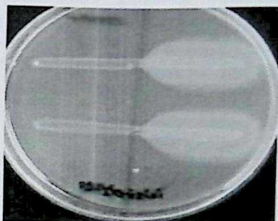


Рисунок 112. Тест Неглера – для определения лецитиназаположительных бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Идентификация завершается проведением реакции нейтрализации токсинов со специфическими антитоксическими сыворотками.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителей клостридии
2. Расскажите о таксономическом положении клостридии.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства

C.perfringens.

4. Дайте характеристику культуральных свойств *C.perfringens*.
6. Расскажите о биохимических особенностях *C.perfringens*.
7. Какие антигены присущи *C.perfringens*?
8. Расскажите о факторах патогенности *C.perfringens*.
9. Охарактеризуйте патогенез *C.perfringens*.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики *C.perfringens*.
11. Какие методы используются для диагностики *C.perfringens*?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика *C.perfringens*?

Clostridium septicum - возбудитель злокачественного отека животных различных видов, а также браздота овец. Микроорганизм патогенен и для человека, являясь одним из самых распространённых возбудителей газовой гангрены.

История открытия. *C. septicum* впервые был выделен Л. Пастером в 1874 г. из трупа животного, павшего с признаками, характерными для сибирской язвы. В последующих работах Р. Кохом было подтверждено это открытие, а Орлуэном в 1892 г. выделена чистая культура микроорганизма.

Морфология. Бактерии представляют собой подвижные длинные палочки с закругленными концами размером 0,6-2,0 x 2-35 мкм, окрашивающиеся грамположительно в молодых и грамтрицательно в старых культурах. Образуют споры овальной формы, расположенные субтерминально или центрально.

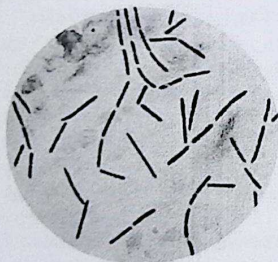


Рис.113.- *Clostridium septicum* окрашено по Граму.
Займствовано из Интернет-ресурсов

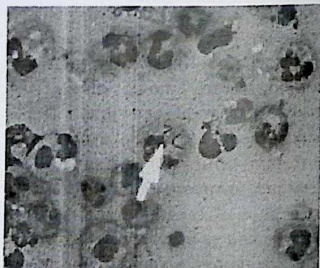


Рис.114.- *Clostridium septicum*, полученный из свободной интраабдоминальной жидкости.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. Полиморфные подвижные палочки размером 4-5x0,8 мкм. В тканях способны образовывать нити длиной до 500 мкм; в культурах образуют цепочки. Строгие анаэробы, но сохраняют жизнеспособность при доступе кислорода в течение 10 ч. На поверхности твёрдых сред образуют блестящие полупрозрачные колонии (диаметром до 4 мм) с неровными краями (имеют тенденцию к ползучему росту). На агаре Цейссlera через 48

ч палочки образуют сплошной нежный налёт, окружённый зоной гемолиза. В столбике 1% агара формируют колонии с отходящими переплетающимися нитями, на 2% агаре колонии имеют вид дисков, иногда с протуберанцем

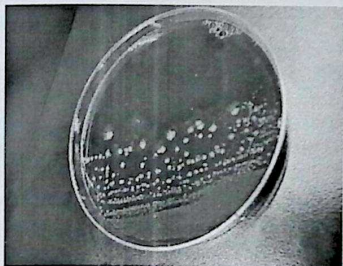


Рис. 115 – Рост *Clostridium septicum* на кровяном агаре.
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства. Микроб медленно разжижает желатину, индола не образует, восстанавливает нитраты в нитриты, разлагает белки с выделением сероводорода и аммиак; ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, левулезу, галактозу, мальтозу, лактозу, салицин, молоко свертывает медленно. Кусочки мяса в МПБ краснеют. Мозговой бульон не чернеет

Антигенная структура. Антигенная структура. В составе *Cl. septicum* выделены О- и Н-ан-тигены. Установлено, что имеется общность споровых антигенов у *Cl. septicum* и *Cl. chauvoei*, но они могут четко дифференцироваться по О-антигену. С помощью Н-агглютинации внутри вида *Cl. septicum* выявлено шесть серологических групп.

Факторы патогенности. *Cl. septicum* синтезирует высокоактивный экзотоксин сложного состава. Токсин может быть выделен из фильтрата культур на бульоне Мартена (рН 7,6 -7,8), на средах из кислотного и ферментативного гидролизата казеина. В составе токсина обнаруживают четыре растворимых компонента (α , β , γ , δ). Альфа-токсин - кислородостабильный летальный, некротический и гемолитический фактор. Бета-токсин -

кислородолабильный гемолизин. Является ферментом дезоксирибонуклеазой. Вызывает быстрый гемолиз. Нейтрализуется антисывороткой *Cl. perfringens*. Гамма-токсин - фермент гиалуронидаза. Дельта-токсин - кислородолабильный гемолизин, лизирующий эритроциты барана, лошади и человека. В культуральных фильтратах этого микроба, кроме указанных токсических компонентов, обнаружены еще фибринолизин и коллагеназа, которые могут играть некоторую роль в деструктивных процессах при газовой гангрене.

Патогенез. Являясь постоянным обитателем кишечного тракта, при нарушении секреторной и моторной деятельности кишечника *Cl.septicum* начинает бурно размножаться и выделяет большое количество токсина, что вызывает общее заболевание животного со всеми клиническими проявлениями браздота: повышение температуры (39,5-40,5°C). Отмечается отсутствие аппетита, учащенное дыхание, истечение из носовой и ротовой полостей кровянистой жидкости, кровяной понос и тимпания, часто появляются отеки в области шеи, подгрудка. Смерть наступает через несколько часов после появления первых признаков заболевания. Экзотоксин состоит из 4 компонентов – альфа, бета, гамма и дельта токсины.

Диагностика. Болезнь диагностируют с учетом эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, а также результатов лабораторного исследования.

Решающее значение имеет бактериологический анализ. Проводят микроскопию мазков, получение чистой культуры и ее идентификацию, заражение лабораторных животных (белая мышь, морская свинка) и определение вида возбудителя

Дифференциальный диагноз. При дифференциальной диагностике необходимо исключить некротический гепатит овец, пастереллез, пироплазмоз, ацидоз и алкалоз, необходимо исключить сибирскую язву (для данной болезни характерна увеличенная селезенка, кровь дегтярного цвета, несвернувшаяся), энтеротоксемию (размягченная почка), эмкар (наличие в мышцах крепитирующих припухлостей), а также кормовые отравления.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия *Clostridium septicum*

2. Расскажите о таксономическом положении *Clostridium septicum*.

3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства

Clostridium septicum.

4. Дайте характеристику культуральных свойств *Clostridium septicum*.

6. Расскажите о биохимических особенностях *Clostridium septicum*.

7. Какие антигены присущи *Clostridium septicum*?

8. Расскажите о факторах патогенности *Clostridium septicum*.

9. Охарактеризуйте патогенез *Clostridium septicum*.

10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики *Clostridium septicum*.

11. Какие методы используются для диагностики *Clostridium septicum*?

12. В чем заключается бактериологическая диагностика *Clostridium septicum*?

13. Дифференциальная диагностика *Clostridium septicum*

Clostridium chauvoei — возбудитель эмфизематозного карбункула. Остро протекающая неконтагиозная токсико-инфекционная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся образованием быстро увеличивающихся крепитирующих припухлостей в мышцах тела и хромой.

История. Болезнь известна с древнейших времен. Первое научное описание ее дано в 1872 г. Ф. Шабером, дифференцировавшим эмкар от сибирской язвы. Впервые возбудитель был выделен в 1876 г. Боллингером и Фезером, а затем изучен и описан Орлуэном в 1881 г, давшим ему название *C. chauvoei* в честь французского ученого J. Chauveau.

Эмфизематозный карбункул крупного рогатого скота распространен во всех странах мира независимо от географического расположения и почвенно-климатических условий. В неблагополучных хозяйствах причиняет большой ущерб из-за гибели животных и затрат на проведение противоэпизоотических мероприятий.

Морфология. Является строгим анаэробом, представляет собой полиморфные спорсодержащие палочки с закругленными концами размером 0,5-0,7 x 1,6-10 мкм. В молодых, активно растущих культурах, а также в патологическом материале, клетки микроорганизма окрашиваются грамположительно, при дальнейшем культивировании становятся грамотрицательными, а за счет образующихся спор приобретают веретено- или лимonoобразные формы.

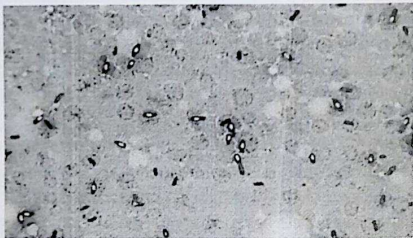


Рисунок 116. *Clostridium chauvoei* окрашено по Граму.
Займствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование. На МППБ – помутнение, осадок, газообразование незначительное. На кровяном агаре культуры образуют колонии в форме виноградного листа или перламутровой пуговицы, окруженные тонкой зоной гемолиза. Старые культуры имеют запах прогорклого масла.

Биохимические свойства. На жидких средах растут интенсивно со слабым газообразованием, желатин разжижают, в мозговой среде не дают почернения. Молоко свертывают медленно. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, лактозу. Образуют незначительное количество индола.

Антигенная структура. В составе антигенов ЭМКАР выделены термостойкий соматический О-антиген и термолабильный жгутиковый Н-антиген. Они обладают видовой специфичностью и являются общими у всех штаммов. Однако имеются наблюдения, что Н-антиген *C. chauvoei* выделяемый от

крупного рогатого скота и овец, различен. Кроме того дифференцирован споровый S-антиген, общий с *Clostridium septicum*. Что приводит к перекрестной агглютинации у этих двух клостридий.

Факторы патогенности: экзотоксин, гиарулонидаза, гемолизин. Несмотря на отсутствие выраженной токсигенности, *S. chauvoei* обладает значительным количеством факторов вирулентности, таких как холестеролзависимые цитоллизины, гиалуронидаза, ДНК-аза, нейраминидаза, а также гемолитической и цитотоксической активностью.

Патогенез. Заражение животных чаще происходит через поврежденные оболочки пищеварительного тракта, куда бактерии попадают с кормом, загрязненным почвой, реже воротами инфекции становятся открытые раневые поверхности. Доказанным считается также перенос возбудителя слепнями. Преодолев барьер слизистых, *S. chauvoei* разносится кровью по органам и тканям. Локализуется в мышечной ткани, где начинает размножаться, выделяя газ, токсины и агрессивные вещества. Под их воздействием происходят дистония кровеносных сосудов, мукоидное набухание миоцитов, увеличение проницаемости стенок капилляров и развитие отека в межмышечной ткани. Экзотоксины и споры распространяются с отечной жидкостью и экссудатом в другие органы и ткани. Усиление интоксикации организма приводит к возникновению дистрофических процессов в миокарде, легких, печени, почках и других органах. Причиной смерти животных становится паралич миокарда.

Диагностика. Диагноз на эмфизематозный карбункул устанавливают на основании эпизоотологических данных, симптомокомплекса болезни с учетом патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований (микроскопии мазков-отпечатков, бактериологического исследования и биопробы на морских свинках).

Трупы во избежание распространения возбудителя болезни вскрывать не рекомендуется. Поэтому кусочки мышц отбирают без полного вскрытия трупа. Если труп случайно вскрыт, берут кусочки паренхиматозных органов, подкожной клетчатки, отечный экссудат, кровь. При пересылке лучше использовать хорошо высушенные мышцы.

Окончательный диагноз устанавливают при выделении культуры возбудителя из патматериала и гибели морской свинки после заражения ее полученной культурой и наличии типичной патологоанатомической картины или положительной биопробе с характерной патологоанатомической картиной и выделением культуры.

Дифференциальный диагноз. При дифференциальной диагностике необходимо прежде всего исключать сибирскую язву и злокачественный отек.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия *Clostridium chauvoei*
2. Расскажите о таксономическом положении *Clostridium chauvoei*.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства *Clostridium chauvoei*.
4. Дайте характеристику культуральных свойств *Clostridium chauvoei*.
6. Расскажите о биохимических особенностях *Clostridium chauvoei*.
7. Какие антигены присущи *Clostridium chauvoei*?
8. Расскажите о факторах патогенности *Clostridium chauvoei*.
9. Охарактеризуйте патогенез *Clostridium chauvoei*.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики *Clostridium chauvoei*.
11. Какие методы используются для диагностики *Clostridium chauvoei*?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика *Clostridium chauvoei*?
13. Дифференциальная диагностика *Clostridium chauvoei*

***Clostridium novyi* (*Clostridium oedematiensi*)** — возбудитель некротический гепатит овец (лат. — *Infectious necrotica*; англ. — *Black disease*; черная болезнь) — остро протекающая токсико-инфекционная болезнь овец, характеризующаяся некротическим поражением печени и быстрой гибелью заболевших животных.

История. *Clostridium novyi* типа В (ранее назывался *C. oedematiens*, *C. gigas*) впервые был выделен Нови в 1894 г. из трупов морских свинок, павших с признаками злокачественного отека. В 1915 г. М. Вайнберг и Р. Сеген выделили этот микроб при газовой гангрене у человека, сопровождающейся сильной интоксикацией. Ими было присвоено микроорганизму название *Bacillus oedematiens*. В 1934 г. исследователями Скоттом, Турнером и Вовтером было предложено разделить вид на четыре типа в зависимости от источника происхождения, патогенности и ферментации глицерина. Практически одновременно Albiston доказал, что «черная болезнь» и «немецкий браздот» в Германии и Австралии представляют собой одно и тоже заболевание и вызываются *C. Novyi* (*C. Oedematiens*).

Морфология. Крупная полиморфная прямая или слегка изогнутая с закругленными, иногда обрубленными краями палочка, длиной 4 -8 мкм и шириной 1 -1,5 мкм; бактерии могут располагаться короткими цепочками по 3 -5 и более клеток. Капсул не образует. В молодых культурах палочки подвижны (перитрихи), в присутствии кислорода подвижность быстро теряется. Образует круглые или овальные субтерминальные споры, которые обычно обнаруживаются через 24 ч роста культуры. Процесс спорообразования более интенсивный на щелочных средах, обедненных питательными веществами и разлагаемыми углеводами. Хорошо окрашиваются спиртоводными растворами обычных анилиновых красок. Молодые вегетативные клетки грамположительные, из старых культур - грамтрицательные.

Культивирование. *Cl. novyi* - один из наиболее строгих анаэробов. Оптимальная температура 37°C, pH 7,8. На среде Китт - Тароцци дает обильный рост со сплошным помутнением и слабым газообразованием. Культуры издают неприятный запах. На кровяном агаре с глюкозой растет в виде шероховатых серого цвета плоских колоний с неправильными бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии колоний параллельные петли. Колонии окружены зоной гемолиза. Мозговая среда не чернеет. Молоко свертывается медленно с выпадением мелких хлопьев, пептонизация не наступает. Медленное разжижение желатина

Биохимические свойства. Сахаролитические свойства выражены слабо и различны у отдельных типов. *Cl. novyi* типа А, В

и С ферментирует глюкозу, фруктозу и мальтозу, а тип D только глюкозу; глицерин разлагают все типы, кроме некоторых штаммов типа В. Способность разлагать углеводы изменяется в зависимости от штамма. Протеолитические свойства выражены слабо. Желатина разжижается медленно, свернутая сыворотка крови, вареное мясо, казеин и свернутый яичный белок не разжижаются. Нитраты восстанавливаются в аммиак без прохождения стадии нитритов. Сульфаты не восстанавливаются в сероводород, индол не образуется.

Антигенная структура. Антигенная структура. По составу растворимых антигенов токсина различают четыре типа Cl. *pouvi* - А, В, С и D.

Факторы патогенности. Злокачественный отек, обусловленный Cl. *pouvi* может возникать вследствие любого ранения, инфицированного этим возбудителем. Исход болезни, как правило, смертельный. Cl. *pouvi* в организме и при росте на элективных питательных средах синтезирует и выделяет очень активный и сложный токсин, в составе которого обнаружено восемь компонентов. К числу лучше изученных относят альфа-, бета-, гамма- и дельта-токсины. Альфа-токсин - термолабильный, летальный, некротический, капиллярный яд. Вызывает некроз тканей, желатинозный отек и гибель животных. Бета-токсин - фосфорлипаза С (лецитиназа). Обладает некротическим, гемолитическим и летальным действием. Гамма-токсин - фосфорлипаза D. Некротизирующий и гемолитический факторы. Дельта-токсин - кислородолабильный гемолизин. Экзотоксин Cl. *pouvi* по активности превосходит токсины других возбудителей газовой гангрены. Он сильнее других токсинов угнетает фагоцитоз и обладает четким гемолитическим действием, которое нейтрализуется специфической антитоксической сывороткой, ему присущи летальные и некротические свойства и диффузионная активность. Токсин разрушается при нагревании до 50°C в течение 30 мин. Этот микроб также образует ферменты патогенности - гиалуронидазу, фибринолизин, дезоксирибонуклеазу, протеин азы.

Тип А - Cl. *pouvi* (Cl. *oedematiens*) - вызывает газовую гангрену у человека и животных, выделяется также при браздоте. Вырабатывает альфа-, гамма- и дельта-токсины. Тип В - Cl. *gigas* - является возбудителем браздота овец, инфекционного некротического гепатита овец, а также газовой гангрены человека и

травоядных. Может вызывать у крупного рогатого скота и свиней инфекционный некротический гепатит. Вырабатывает альфа- и бета-токсины. Тип С - *Cl. bubalorum* - вызывает хронический остеомиелит у буйволов, продуцирует гамма-токсин. Тип D - *Cl. haemolyticum* - вызывает инфекционную иктерогемоглобинурию у крупного рогатого скота, очень редко у овец и в единичных случаях у свиней. Синтезирует бета-токсин, а также эта- и тэта-токсины. Первый из них фермент тропомиозиназа, расщепляет миозин и повреждает мышцы.

Патогенез. Патогенез болезни раскрыт не полностью. Проникнув через пищеварительный тракт, возбудитель, по-видимому, из желудочно-кишечного тракта попадает с личинками гельминтов в печень. В поврежденной миграцией личинок гельминтов печеночной ткани создаются условия анаэробно-близкого, благоприятные для размножения возбудителя и образования им токсина. Последний, обладая выраженными некротическими свойствами, расширяет очаги первичного поражения и способствует интенсивному размножению возбудителя, а также вызывает системный эффект — интоксикацию организма и гибель животных. Состояние, известное под названием «большая голова», у баранов развивается тогда, когда возбудитель проникает в подкожные ткани.

Устойчивость. Вегетативные формы по своей устойчивости не отличаются от других видов патогенных анаэробов. Они погибают от воздействия прямых солнечных лучей через 24 -48 ч, ультрафиолетовых лучей через 20 -30 мин. Нагревание до 80°C убивает их за 20 мин, кипячение за 5 мин. Споры могут сохраняться в почве в течение 7 -8 лет и выдерживать кипячение 1 - 2 ч.

Диагностика. Диагноз основан на анализе эпизоотологических, клинических данных, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Лабораторную диагностику проводят, как при исследовании на браздот, с единственным отличием: при биопробе на морских свинках на месте заражения образуется студенистый желтоватого или бледно-розового цвета отек соединительной и прилегающей мышечной ткани. Мышцы бледные, внутренние органы без изменений.

Чистую культуру возбудителя удастся выделить из печени при посеве материала, взятого на границе здоровой и некротически измененной паренхимы печени.

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить фасциолез, инфекционную энтеротоксемию овец, браздот, сибирскую язву и острые случаи отравления. При всех перечисленных болезнях отсутствуют характерные некротические очаги в печени павших животных.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия *Clostridium novyi*
2. Расскажите о таксономическом положении *Clostridium novyi*.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства *Clostridium novyi*.
4. Дайте характеристику культуральных свойств *Clostridium novyi*.
6. Расскажите о биохимических особенностях *Clostridium novyi*.
7. Какие антигены присущи *Clostridium novyi*?
8. Расскажите о факторах патогенности *Clostridium novyi*.
9. Охарактеризуйте патогенез *Clostridium novyi*.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики *Clostridium novyi*.
11. Какие методы используются для диагностики *Clostridium novyi*?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика *Clostridium novyi*?
13. Дифференциальная диагностика *Clostridium novyi*

Clostridium tetani – возбудитель столбняка, раневая токсическая инфекция, характеризующаяся поражением нейротоксином двигательных функций мускулатуры тела. Столбняком болеют различные виды сельскохозяйственных животных и люди. Наиболее восприимчивы к нему в естественных условиях лошади и овцы.

История открытия. Столбняк известен с древности, первое чёткое описание клинической картины дано Гиппократом (от столбняка умер его сын). Возбудитель был открыт в 1883 г. Н.Д. Монастырским и в 1884 – А. Николайером. Оба они сообщили о своих открытиях в 1885 г. Чистую культуру микроорганизма выделил

в 1887 г. японский бактериолог С. Китазато, он же в 1890 г. получил столбнячный токсин совместно с Э. Берингом и предложил для лечения столбняка антитоксическую противостолбнячную сыворотку. В 1923-1926 гг. французскому исследователю Г. Рамону удалось получить столбнячный анатоксин, который в дальнейшем стал применяться для профилактики заболевания.

Морфология. *Clostridium tetani* - Возбудитель тонкая подвижная палочка, длиной 4-8 мкм и шириной 0,4-0,6 мкм. Подвижная, капсулы не образует. Споры круглые, располагаются терминально, придавая возбудителю вид булавки или барабанной палочки. Грамположительная, но в старых культурах становится грамотрицательной, окрашивается всеми анилиновыми красками.

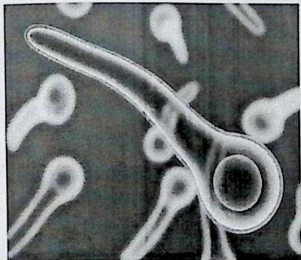


Рис.117. Возбудитель *C. tetani* имеет вид булавки или барабанной палочки. Заимствовано из Интернет-ресурсов

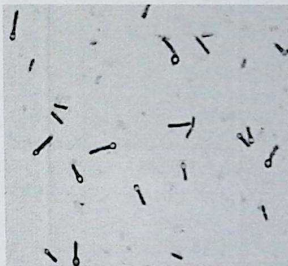


Рис. 118. *C. tetani* окрашено по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Культивирование – строгий анаэроб. Оптимальная температура для роста 37°C. На среде Китта-Тароцци рост медленный с равномерным помутнением и редким газообразованием (сахаролитическими свойствами не обладает). Культура издает своеобразный запах. На мясо-пептонном агаре и желатине в строго анаэробных условиях возбудитель растет медленно. Рост колоний характерный – сначала на поверхности среды появляется сеточка, образованная сливающимися колониями с отростками. Растет в виде прозрачных или серовато-желтых шероховатых (R) и гладких (S)

колоний. При посеве столбиком в полужидкий агар через 24-48 ч формирует колонии в виде чечевичек (R-форма) или пушинок плотным коричневым центром (S-форма). В столбике агара колонии в виде комочков ваты. Благоприятные условия для роста *C. tetani* имеют также сахарно-кровяной агар и среда Китта-Тароцци. На кровяном агаре колонии круглые, плоские, с неровными краями, полупрозрачные, серые, нередко в виде переплетающихся нитей, напоминающих пучков; вокруг колоний – зона гемолиза..

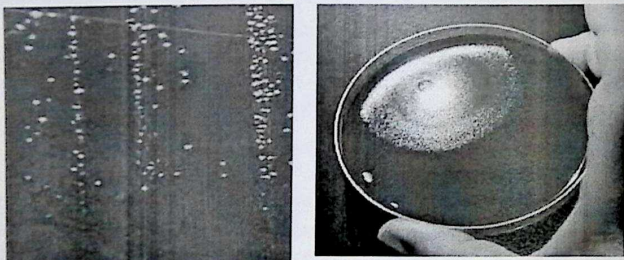


Рис. 119. Колонии *Clostridium tetani* на кровяном агаре. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Биохимические свойства. *C. tetani* обладает слабой биохимической активностью. Нерасщепляет углеводы, но есть штаммы, ферментирующие глюкозу. Обладает слабыми протеолитическими свойствами. Постепенно расщепляет белки и пептоны до аминокислот, Медленно гидролизуют желатин, свертывают молоко, не образуют индола, восстанавливают нитраты и нитриты

Антигенная структура. Имеет О-и Н-антигены. По составу Н-антигена делится на 10 серотипов. Все серотипы имеют один и тот же О-антиген и секретируют экзотоксин с одинаковыми антигенными свойствами.

Факторы патогенности. Патогенностью обусловлена способностью *C. tetani* продуцировать *мощный экзотоксин – тетаноспазмин* (нейротоксин) действующий на нервные клетки и вызывающий характерный для столбняка клинический синдром и *тетанолизин* (тетаногемолизин) вызывающий гемолиз эритроцитов. Тетанолизин – слабо изучен. Способность к токсинообразованию

закодирована в плазмиде и неодинаково выражена у разных штаммов – от нетоксигенных до высокотоксигенных вариантов. Токсин накапливается внутри бактериальных клеток и высвобождается при аутолизе клеток и образовании спор.

Патогенез. Столбняк – токсинемическая инфекция, основным фактором патогенеза которой является столбнячный экзотоксин. Возбудитель остается в ткани на месте входных ворот; продуцирует экзотоксин, который поступает в кровь и распространяется по кровеносным и лимфатическим сосудам, а также по нервным стволам, и достигает спинного и продолговатого мозга. Токсин фиксируется на поверхности отростков нейронов, проникает в них за счет лиганд-опосредованного эндоцитоза и посредством ретроградного аксонного транспорта попадает в ЦНС. В результате нарушается проведение импульсов по нервным волокнам.

Тетанолизин выделяется из клеток с первых дней развития культуры с помощью механизма активного транспорта. Он разрушает эритроциты и, возможно, другие клетки. Вызывая гемолиз и подавляя фагоцитоз способствует распространению возбудителя в организме и продукции им токсинов.

Первыми признаками болезни являются: затруднение приема пищи, объясняющегося наличием судорог жевательных мышц, неподвижностью ушных раковин, выпадением третьего века. В дальнейшем развитие болезни сопровождается резкими судорожными сокращениями мускулатуры всего тела (мышцы шеи, спины, крупа), повышенной рефлекторной возбудимостью к внешним раздражениям (прикосновение, резкий стук и пр. животные стоят широко расставив ноги, вытянув шею и хвост). Заболевание при отсутствии лечения заканчивается гибелью животного.

Лабораторная диагностика. Обычно проводится ввиду выраженной картины болезни. Бактериологическая диагностика столбняка заключается в выделении и идентификации возбудителя и в обнаружении его токсина в исследуемом материале. Для исследования берут от больных кусочки ткани из мест проникновения возбудителя в организм, экссудат, инородные тела, тампоны из раны. При подозрении столбняка у новорожденных животных посылают труп целиком.

При дифференциальной диагностике необходимо исключить бешенство, острый мышечный ревматизм и кормовые отравления. У

лошадей, кроме того, инфекционный энцефаломиелит, у молочных коров — травяную тетанию.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия *Clostridium tetani*
2. Расскажите о таксономическом положении *Clostridium tetani*.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства *Clostridium tetani*.
4. Дайте характеристику культуральных свойств *Clostridium tetani*.
6. Расскажите о биохимических особенностях *Clostridium novyi*.
7. Какие антигены присущи *Clostridium tetani*?
8. Расскажите о факторах патогенности *Clostridium tetani*.
9. Охарактеризуйте патогенез *Clostridium tetani*.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики *Clostridium tetani*.
11. Какие методы используются для диагностики *Clostridium tetani*?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика *Clostridium tetani*?
13. Дифференциальная диагностика *Clostridium tetani*

24. Возбудители колибактериоза

Эшерихиоз (лат., англ. — *Escherichiosis*; колибактериоз, колиэнтерит, колисепсис) — остро протекающая зоонозная болезнь молодняка животных многих видов, проявляющаяся септицемией, токсемией и энтеритом, обезвоживанием организма, поражением центральной нервной системы, нарастающей депрессией и слабостью, иногда пневмонией и артритами.

Таксономическое положение. Эшерихии относятся к типу *Proteobacteria* классу *Gammaproteobacteria* порядку *Enterobacteriales* семейству *Enterobacteriaceae* роду *Escherichia*. Основным видом рода *Escherichia*, является *Escherichia coli* (кишечная палочка). По антигенным свойствам эшерихии подразделяются на серогруппы. К настоящему времени известно более 9000 серологических вариантов эшерихий по О-, К- и Н-антигенам, однако лишь незначительная часть способна вызывать кишечные инфекции у животных и

человека. Ведущая роль в развитии диареи новорожденных поросят, телят, ягнят принадлежит энтеротоксигенным штаммам эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, F41, F18, A20, Att25 различных O-серогрупп.

История открытия. Возбудитель болезни впервые выделил и описал Т. Эшерих (1885), в честь которого микроб был назван *Escherichia coli*. Долгое время болезнь была известна под названием «колибактериоз». В настоящее время носит название «эшерихиоз». Болезнь, широко распространенная повсеместно на земном шаре, служит одной из основных причин заболевания и гибели молодняка сельскохозяйственных животных, в результате чего причиняет большой экономический ущерб.

Морфология. Возбудитель *E. coli* — короткая толстая с закругленными концами, грамотрицательная палочка, имеют, пили (фимбрии), чаще подвижный за счет перитрихально расположенным жгутикам, спор не образует, аэроб или факультативный анаэроб, хорошо растет на обычных питательных средах, в мазках располагается одиночно. Большинство штаммов имеет капсулу или микрокапсулу.

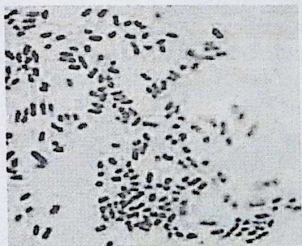


Рисунок 120- Чистая культура *E.coli*. Окраска по Граму. Заимствовано из Интернет-ресурсов

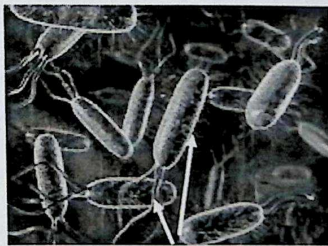


Рисунок 121 – Электронная микрофотография клетки *E.coli*: 1 – жгутики, 2 – пили. Заимствовано из Интернет-ресурсов.

Культивирование. *E.coli* является аэробом или факультативным анаэробом. Температура оптимального роста $T^{°37°C}$, pH 6,5 – 7,4. Хорошо растут на простых средах, образуя на агаре колонии средней величины, влажные, блестящие, прозрачные и

непрозрачные, в S-форме – круглые с ровным краем, в R-форме – более плоские, сухие. В бульоне растут диффузно или образуют осадок, иногда пленку на поверхности и пристеночное кольцо.

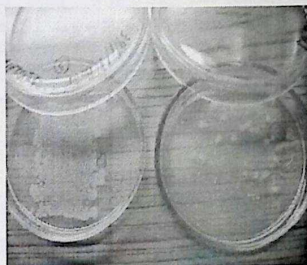
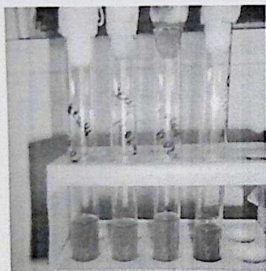


Рисунок 122-Рост *E. coli* на МПБ Рисунок 123-Рост *E. coli* на МПА

Для установления родовой и видовой принадлежности культур большое значение имеет выявление биохимических свойств и культивирование на специальных средах — Эндо, Левина и др. На среде Эндо лактозоположительные штаммы *E. coli* образуют колонии темно-малинового цвета с металлическим блеском или без него, на среде Левина (ЭМС) – колонии темно-синего цвета; штаммы, неферментирующие лактозу, дают бесцветные колонии.

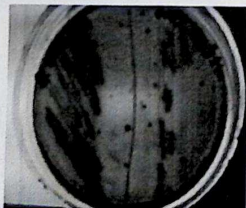


Рис. 124.-*E. coli* –
лактозоположительные
малиново-красные колонии
с металлическим блеском
на среде Эндо



Рис. 125.-*Escherichia coli* –
лактозоположительные штаммы
образуют темные (черные)
колонии на среде Левина

Агар Плоскирева-ГРМ обеспечивает рост и четкую дифференциацию шигелл и сальмонелл от эшерихий через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Агар Плоскирева-ГРМ полностью подавляет рост стафилококка и в 2-3 раза рост кишечной палочки. На среде Плоскирева лактозоположительные штаммы кишечной палочки образуют колонии брусничного цвета (рисунок 126).

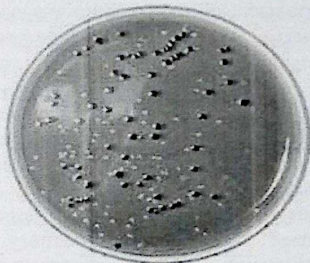


Рис. 126 –Рост *E. coli* на среде Плоскирева. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Висмут-сульфитный агар используется для выделения сальмонелл. Входящие в состав бриллиантовый зеленый и висмут лимоннокислый обладают сильным ингибирующим эффектом. Дифференцирующие свойства проявляются на вторые-третьи сутки инкубирования засеянных чашек четкой дифференциацией *Salmonella* spp. от кишечной палочки.

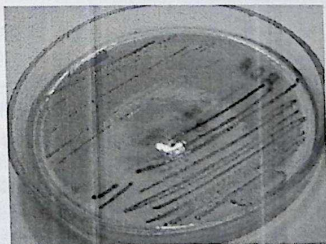


Рис. 127 –Рост *E. coli* на висмут-сульфитном агаре

Биохимические свойства. Для установления родовой и видовой принадлежности культур большое значение имеет выявление биохимических свойств. Ферментируют углеводы и спирты до кислоты или кислоты и газа: постоянно — глюкозу, маннит, непатогенные штаммы разлагают лактозу, не ферментируют адонит и инозит. Другие углеводы и спирты сбраживают variabelно. Образуют индол, но не сероводород, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Не имеют уреазы, липазы, желатиназы, дают положительную реакцию с метиловым красным, постоянно разлагают лизин, не расщепляют фенилаланин.

Антигенная структура. Кишечная палочка содержит три вида антигенов: О-соматический, К-оболочечный и Н-жгутиковый. *О-антиген* состоит из липополисахаридного комплекса и располагается в клеточной стенке. По этому антигену кишечные палочки делятся более чем на 173 серогрупп. *К-антиген* расположен более поверхностно, поэтому живые культуры кишечной палочки не обладают способностью к агглютинации с О-антителами. К-антиген состоит из типов А, В и L, различающихся по чувствительности к температуре и химическим веществам. Каждый штамм имеет только один тип К-антигена. У эшерихий обнаруживают до 100 разновидностей К-антигена, относящихся к типу В. Эшерихии имеют 57 разновидностей Н-антигена. *Н-антиген* связан со жгутиками и обнаруживается только у подвижных штаммов. По этому антигену эшерихии делятся на 75 серотипов. Сочетание антигенов определяет специфичность отдельных серологических типов кишечной палочки, их биологические особенности и свойства.

Факторы патогенности. Основными факторами патогенности эшерихий являются факторы адгезии и колонизации, факторы инвазии, эндотоксины и экзотоксины. *Факторы адгезии и колонизации* необходимы для прикрепления бактерий к клеткам организма и колонизации тканей. Адгезины представляют собой либо поверхностные фимбриальные структуры (пили), либо нефимбриальные (афимбриальные) белки наружной мембраны. Пили, фимбриальные факторы - адгезия к эпителию слизистых.

Факторы инвазии. Роль факторов инвазии выполняют белки наружной мембраны, кодируемые плазмидой с молекулярной массой 140 МД. Эта плазида идентична плазмиде шигелл,

кодирующей синтез поверхностных белков (РА-антигенов) и белка VirG. С их помощью энтероинвазивные *E. coli* проникают в эпителиальные клетки кишечника, размножаются в них и вызывают их разрушение. Возбудителю эшерихиоза присущи полидетерминированность факторов вирулентности: эндотоксины, экзотоксины (энтеротоксины), колицин, фактор колонизации (адгезии) и др. *Экзотоксины*. К числу экзотоксинов эшерихий относятся энтеротоксины и шига-подобные токсины. *Энтеротоксины* стимулируют гиперсекрецию эпителиальными клетками кишечника ионов натрия, калия, хлора, бикарбонат-ионов, что приводит к нарушению водно-солевого обмена и развитию диареи. Существуют термолабильные энтеротоксины (LT - *labile toxin*) и термостабильные энтеротоксины (ST - *stable toxin*). Для обнаружения циркулирующих в хозяйствах эшерихий недостаточно определения их по О-серогруппе, необходимо учитывать такие факторы, как токсигенность и инвазивность (адгезия).

Патогенез. При поступлении в организм алиментарным путем возбудитель способен вызвать патологический процесс. При септической форме возбудитель локализуется в крови, внутренних органах и тканях, кишечнике и регионарных лимфатических узлах; при эн-теритной форме — в кишечнике и брыжеечных лимфатических узлах; при колиэнтеротоксемии поросят — в тонком отделе кишечника, брыжеечных лимфатических узлах, реже в паренхиматозных органах.

Если возбудитель проник через слизистые оболочки органов дыхания, глотки, миндалины, пупочный канатик, то, как правило, развивается болезнь септической формы, не успевает проявиться диарея, поскольку животное быстро погибает. Бактериemia может развиваться и при энтеритной форме, когда заражение происходит энтеропатогенными и энтеротоксигенными штаммами кишечной палочки. В этом случае болезнь протекает менее остро и начинается с диареи, поражается тонкий кишечник, при этом выделяются другие микроорганизмы — сапрофиты кишечной полости и быстро накапливается возбудитель.

Репродукция гемолитических штаммов кишечной палочки в полости кишечника приводит к возникновению в тканях воспалительных процессов и накоплению избыточного количества

гистамина, что вызывает развитие токсикоза, появление отеков, нервных расстройств, возможны коллапс и шок.

Лабораторная диагностика Эшерихиоз в хозяйстве устанавливают на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов бактериологического исследования материала от павших животных.

При подозрении на эшерихиоз в ветеринарную лабораторию направляют трупы некрупных животных или патологический материал: сердце, сосуды которого перевязывают, трубчатую кость, селезенку, долю печени с желчным пузырем, головной мозг, брыжеечные лимфатические узлы, соответствующие пораженным участкам кишечника, и в отдельной посуде — отрезок тонкой кишки, перевязанный с двух концов.

Для прижизненной бактериологической диагностики в лабораторию отправляют фекалии (не менее чем от пяти животных с одной фермы) массой 1-2 г от каждого больного животного, не леченного антибиотиками, не позднее 2 ч после получения из прямой кишки.

Бактериологическое исследование включает выделение и идентификацию эшерихий, определение в реакции агглютинации (РА) или реакции коагглютинации (РКоА) серологической группы культуры и патогенности ее для белых мышей и цыплят.

Для проведения реакции агглютинации на стекле используют диагностические поливалентные эшерихиозные сыворотками групп ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД и ОКЕ (рисунок 128).



Рис. 128 – Диагностические поливалентные эшерихиозные сыворотки. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Диагноз считают установленным:

1) при выделении культур эшерихий из селезенки, костного или головного мозга без определения их серогруппы и патогенности;

2) при выделении из двух и более органов патогенных для белых мышей и цыплят культур или культур, отнесенных по реакции агглютинации или коагглютинации к энтеропатогенным серогруппам.

Дифференциальная диагностика. Эшерихиоз следует исключить от сальмонеллеза, псевдомоноза, стрептококкоза, пастереллеза, протейной инфекции, адено-, рота- и коронавирусных инфекции, диарею незаразного происхождения, отравления.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителя эшерихиоза
2. Расскажите о таксономическом положении эшерихии.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства эшерихии.
4. Дайте характеристику культуральных свойств эшерихии.
6. Расскажите о биохимических особенностях эшерихии.
7. Какие антигены присущи эшерихии?
8. Расскажите о факторах патогенности эшерихии.
9. Охарактеризуйте патогенез эшерихиоза.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики эшерихиоза.
11. Какие методы используются для диагностики эшерихиоза?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика эшерихиоза?
13. Дифференциальная диагностика эшерихиоза

25. Возбудители сальмонеллеза

Сальмонеллезы (лат., англ. — Salmonellosis; паратиф) — большая группа зоонозных болезней преимущественно сельскохозяйственных животных, характеризующихся у молодняка при остром течении лихорадкой, септициемией, токсикозом и диареей, а при подостром и хроническом — пневмонией и артритами; у взрослых самок — абортами; у людей протекает в виде пищевых токсикоинфекций.

История. Впервые сальмонелл (*S. choleraesuis*) выделили из тропов свиней в 1885 г. американские ученые Сальмон и Смит. В дальнейшем, в конце XIX в., аналогичные бактерии были

изолированы от телят, мышей, крыс, цыплят и кур, из абортированных плодов кобыл. Ранее эти болезни были описаны под названием «паратифы». Международное общество микробиологов в 1934 г. рекомендовало именовать бактерии этой группы сальмонеллами (в честь первооткрывателя Сальмона), а болезни, вызываемые ими, — сальмонеллезами. В нашей стране сальмонеллез впервые был установлен в конце 20-х годов прошлого века у телят, овец, свиней, а затем и у других животных.

В настоящее время сальмонеллез широко распространен во многих странах мира, занимает большой удельный вес среди инфекционных болезней и представляет собой крупную ветеринарную и медико-биологическую проблему, поскольку очень велика опасность заражения сальмонеллезом человека от больных животных и через пищевые продукты.

Таксономическое положение. Бактерии рода *Salmonella*, отнесенные к семейству энтеробактерий, в настоящее время объединяют более 2300 сероваров, разделенных на 52 серогруппы, большинство из которых имеют самостоятельные названия. Сейчас в род Сальмонелл входят два вида: *S. bongori* и *S. enterica*, этот вид делится на 6 подвидов, которые в свою очередь подразделяются на серотипы. Основные возбудители сальмонеллеза животных относятся к серогруппам В, С и D по Кауфману–Уайту.

Серологическая классификация сальмонелл по Кауфману–Уайту

Серотип	Соматический антиген	Жгутиковый антиген	
		1-я фаза	2-я фаза
<i>S. paratyphi</i> A	Гр. А 1, 2, 12	a	-
<i>S. paratyphi</i> B	Гр. В 1, 4, 5, 12	b	1, 2
<i>S. typhimurium</i>	1, 4, 5, 12	i	1, 2
<i>S. abortus – equi</i>	4, 12	-	e, n, x
<i>S. abortus – ovis</i>	4, 12	c	1, 6
<i>S. abortus – bovis</i>	1, 4, 12, 27	b	e, n, x
<i>S. heidelberg</i>	4, 5, 12	г	1, 2
<i>S. derby</i>	1, 4, 12	f, g	1, 2
<i>S. stanley</i>	4, 5, 12	d	1, 2
<i>S. brandenburg</i>	1, 4, 5, 12	l, v	e, n, z15

<i>S. essen</i>	4, 12	g, m	-
<i>S. paratyphi C</i>	Гр. C1 6, 7, Vi	c	1, 5
<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
<i>S. typhisuis</i>	6, 7	c	1, 5
<i>S. braenderup</i>	6, 7	e, h	e, n, z15
<i>S. infantis</i>	6, 7	r	1, 5
<i>S. muenchen</i>	Гр. C2 6, 8	d	1, 2
<i>S. newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
<i>S. bovis morbificans</i>	6, 8	r	1, 5
<i>S. typhi</i>	Гр. D1 9, 12, Vi	d	-
<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	-
<i>S. dublin</i>	1, 9, 12	g, p	-
<i>S. moscow</i>	9, 12	g, q	-
<i>S. sendai</i>	1, 9, 12	a	1, 5
<i>S. gallinarum</i>	1, 9, 12	-	-
<i>S. pullorum</i>	9, 12	-	-
<i>S. anatum</i>	Гр. E1 3, 10	e, h	1, 6
<i>S. london</i>	3, 10	l, v	1, 6

Морфология. Возбудители сальмонеллеза — мелкие, прямые, с закругленными концами грамтрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижные (исключение *S. gallinarum-pullorum*), факультативные анаэробы.

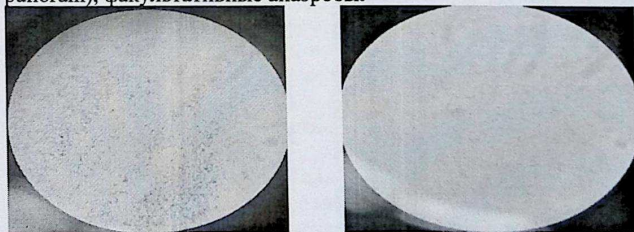


Рисунок 129- *S. gallinarum-pullorum* в препарате окраска по Граму

Культуральные свойства. Факультативные анаэробы. Не требовательны к питательной среде. Хорошо растут на простых

питательных средах при температуре 37°C и pH 7,2-7,6. На плотных питательных средах образуют нежные, гладкие, блестящие, полупрозрачные, слегка выпуклые колонии, на жидких средах - диффузное помутнение. В бульоне гладкие формы дают равномерное помутнение, шероховатые осадок на дне пробирки.

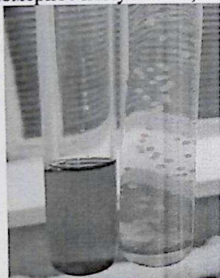


Рисунок 130 – Рост первичной культуры сальмонелл на МПБ и МПА



Рисунок 131 – Рост чистой культуры сальмонелл на МПБ и МПА

Для выделения сальмонелл из патологического материала используют среды обогащения (селенитовый бульон) и селективные питательные среды (желчный бульон).



Рис. 132 – Рост *Salmonella typhi* на среде Эндо
Займствовано из Интернет-ресурсов

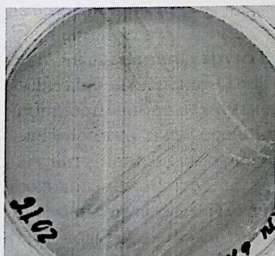


Рис. 133 – Рост *Salmonella typhi* на SS-среде



Рис.134 –Рост *Salmonella typhi* на висмут-сульфитном агаре

На агаре S-формы вырастают в виде небольших колоний d до 2–4 мм прозрачных, нежных, слегка выпуклых с ровным краем. В R-форме колонии более плоские, шероховатые с изрезанными краями. *S. enteritidis*, *S. Paratyphi* через 2–3 суток инкубации при комнатной T° образуют по периферии колоний слизистый вал.

На среде Эндо колонии розоватые, прозрачные, на среде Плоскирева–бесцветные, более плотные и мутноватые. На ВСА–черные с металлическим блеском. На SS-среде круглые, гладкие, бесцветные колонии диаметром 1,0–2,0 мм.

Биохимические свойства. Разнообразны и различаются в пределах одного серовара. Разлагают глюкозу до кислоты и газа (кроме *S. typhi*), неферментируют лактозу, сахарозу, салицини адонит, нерасщепляют мочевины, не образуют сероводород, отсутствует продукция индола, не растворяют желатин, утилизация цитратов среде Симмонса (кроме *S. typhi*). Имеют ферменты лизини орнитиндекарбоксилазы и аргининдигидролазы. Дают положительную реакцию с метиловым красным, образуют ацетонин в реакции Фогес-Проскауэра.

Антигенные свойства. Сальмонеллы обладают соматическим O-антигеном и жгутиковым H-антигеном. Некоторые сальмонеллы обладают разновидностью капсульного антигена - Vi-антигеном.

–O-Ag–соматический, термостабилен. По нему проводится разделение сальмонелл на серогруппы.

–H-Ag–жгутиковый, белковый, термолабилен. Может существовать в 2-х фазах–специфической и неспецифической (или 1-й и 2-й).

-Vi-Ag-Агвирулентности, поверхностный. Термолабилен, разрушается при кипячении через 10 минут.

-К-Аг-поверхностный. Стимулирует синтез АТ.

-М-Аг-слизистый, присутствует у слизистых штаммов.

Серологическую идентификацию проводят с учетом трех основных Аг: О-, Н-и Vi-Ag. Принцип положен в основу диагностической антигенной схемы Кауфмана-Уайта. В 1992 г. было известно 2324 серовара.

Фактор патогенности. К факторам патогенности сальмонелл относятся токсины, пили, белки наружной мембраны, резистентность к фагоцитозу и Vi-антиген.

Эндотоксин выделяется при разрушении бактериальной клетки. Он вызывает развитие лихорадки в случае бактериемии, вызванной сальмонеллами.

Цитотоксины (шига-подобные токсины) угнетают синтез белка на рибосомах энтероцитов.

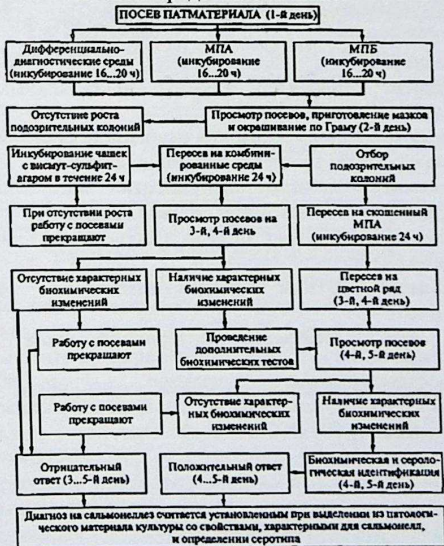
Пили (ворсинки, фимбрии) способствуют адгезии бактерий на клетках слизистой оболочки кишечника.

Факторы инвазии (белки наружной мембраны) обеспечивают сальмонеллам транзитоз через М-клетки слизистой оболочки кишечника.

Vi-антиген способствует устойчивости к фагоцитозу, позволяет сальмонеллам сохраняться и размножаться внутри фагоцитов.

Патогенез Сальмонеллы, попав в кишечник с кормом и водой, размножаются в тонком кишечнике, заселяют толстый, проникают в солитарные фолликулы и пейеровы бляшки, а также мезентеральные лимфатические узлы, из которых попадают в кровь. Заболевание в таких случаях протекает по типу септицемии. Возбудитель, размножаясь частично разрушается, и освобождает эндотоксин. В местах размножения развивается воспаление (слизистая кишечника, желчный пузырь, печень), а эндотоксин обуславливает экссудативные процессы и диapedез с последующим появлением обильных геморрагии на серозных и слизистых оболочках и приводит к некрозам клеток печени, селезенки и почек. Возможны поражения легких, суставов, головного мозга, матки и плода. Гибель животного наступает от обезвоживания, многочисленных кровоизлияний, интоксикации и сепсиса.

Диагностика. Диагноз устанавливают на основании анализа эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, а также результатов бактериологических исследований. Для бактериологического исследования в лабораторию посылают образцы паренхиматозных органов; мезентериальные лимфатические узлы; трубчатую кость; абортёрванные плоды с плодовыми оболочками и околоплодной жидкостью. Для установления сальмонеллоносительства исследуют печень, селезенку. Материалом для прижизненной диагностики служат кровь и фекалии больных животных. Бактериологические исследования проводят в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды». Схема исследования патологического материала на сальмонеллез представлена ниже.



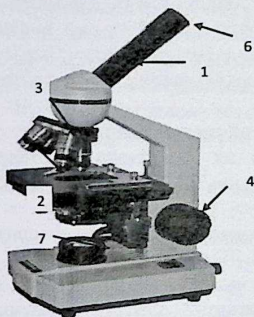
Дифференциальная диагностика. При дифференциальной диагностике у телят исключают эшерихиоз, стрептококкоз, рота- и коронавирусную диарею, аденовирусный пневмоэнтерит и парагрипп; у поросят — эшерихиоз, дизентерию, стрептококкоз, чуму, вирусный гастроэнтерит; у ягнят — анаэробную дизентерию, эймериоз; у жеребят — стрептококкоз, эшерихиоз; у животных всех видов — пастереллез, неспецифические гастроэнтериты, пневмонии, у овцематок и кобыл — бруцеллез, хламидиоз, кампилобактериоз и аборт другой природы. Дифференцируют эти болезни от сальмонеллеза на основании бактериологических и серологических исследований.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите об истории открытия возбудителя сальмонеллеза
2. Расскажите о таксономическом положении сальмонеллеза.
3. Охарактеризуйте морфологические и тинкториальные свойства сальмонеллеза.
4. Дайте характеристику культуральных свойств сальмонеллеза.
6. Расскажите о биохимических особенностях сальмонеллеза.
7. Какие антигены присущи сальмонеллеза?
8. Расскажите о факторах патогенности сальмонеллеза.
9. Охарактеризуйте патогенез сальмонеллеза.
10. Назовите принципы и методы лабораторной диагностики сальмонеллеза.
11. Какие методы используются для диагностики сальмонеллеза?
12. В чем заключается бактериологическая диагностика сальмонеллеза?
13. Дифференциальная диагностика сальмонеллеза

РАЗДЕЛ IV. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

26. Устройство микроскопа и микроскопическая техника



1. Тубус
2. Конденсор
3. Объективы
4. Макровинт
5. Предметный столик микроскопа
6. Окуляр
7. Источник света

Рис. 135- Устройство микроскопа

- 1) поднимите до упора конденсор, поднимите тубус.
- 2) установите объектив малого увеличения (x8).
- 3) вращая зеркало, отрегулируйте освещение так, чтобы все поле зрения было освещено равномерно и ярко.
- 4) На приготовленный и окрашенный мазок нанесите небольшую каплю иммерсионного масла.
- 5) Поместите препарат на предметный столик микроскопа.
- 6) Окрашенные препараты рассматривают только с иммерсионным маслом, объективом(ОИх100). Поворачивая револьвер, установите объектив ОИх100 (объектив с большим увеличением).
- 7) Осторожно опустите объектив с помощью макровинта до соприкосновения с маслом.
- 8) Наблюдая в окуляр, проведите грубую фокусировку макровинтом.
- 9) Окончательную фокусировку произведите с помощью

микровинта (вращение микровинта допускается в пределах одного оборота).

10) Во время микроскопирования правой рукой производите вращение микровинта, левой - передвижение препарата.

В тубус микроскопа сверху вставлен окуляр, а в нижней части он снабжен вращающимся по кругу револьвером, в отверстия которого ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно подвести любой объектив, который после легкого щелчка, закрепится на месте.

Окуляры имеют две линзы (верхнюю и нижнюю). Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний. С уменьшением фокусного расстояния повышается увеличение окуляра. Короткие окуляры будут более сильными, а более слабыми - длинными. Окуляры обозначают по тому увеличению, которые они дают (x5, x7, x10, x12, x15).

Объективы подразделяются на сухие и иммерсионные. Сухим называют такой объектив, между линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. В микробиологии используется иммерсионный объектив (погруженный в масло - кедровое или касторовое, укропное, вазелиновое или др.). Между линзой и рассматриваемым препаратом находится масло (однородная среда). Получается система: стекло препарата - иммерсионное масло - стекло объектива (с одинаковым показателем преломления). Благодаря маслу все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем улучшают изображение микробов, делают его более четким. На оправе объектива обозначается даваемое им увеличение (x8, x10, x20, x40, x100).

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, иммерсионный объектив с увеличением x100 и окуляром x10 дает увеличение объекта в 1000 раз.

Конденсор состоит из системы линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от зеркала, в одной точке - фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата. При микроскопировании с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

Биноккулярный микроскоп имеет два тубуса с окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, меньше утомляется зрение.

Контрольные вопросы:

1. Устройства микроскопа.
2. Что такое окуляры микроскопа?
3. Что такое объективы микроскопа?.
4. Что такое конденсор микроскопа?.
5. Что такое биноккулярный микроскоп

27. Основы культивирования микроорганизмов

Есть два основных принципа культивирования микроорганизмов – *in vivo* и *in vitro*.

а) Микроорганизмы – облигатные паразиты (риккетсии, хламидии, вирусы) можно культивировать только *in vivo*, т.е. внутриклеточно.

Для этого используют методы, разработанные вирусологами и разбираемые в курсе вирусологии – культивирование микроорганизмов в культуре клеток, в курином эмбрионе, в организме лабораторного животного.

б) Микроорганизмы – факультативные паразиты (т.е. все бактерии, кроме риккетсий и хламидий) можно культивировать *in vitro* – на искусственных питательных средах, которые классифицируются по своей консистенции, составу и назначению.

1. В зависимости от их консистенции искусственные питательные среды классифицируются на плотные, полужидкие и жидкие.

а) Плотные питательные среды могут быть агаризованные и свернутые.

1. Агаризованные питательные среды называются так потому, что в качестве уплотнителя в их состав вводят агар – полисахарид, добываемый из морских водорослей определенных видов и используемый для уплотнения питательных сред в бактериологии по такому же алгоритму, как в быту крахмал или желатин. Для получения плотной питательной среды достаточно концентрации агара в пределах 1,5 – 2%. При этом могут использоваться или

чашки Петри («пластинчатый агар») или пробирки (при наличии скоса – «скошенный агар» или «косяк», при его отсутствии – «столбик агара»).

2. Свернутые питательные среды – это плотные среды, содержащие сыворотку крови или обогащенные другим белком (яичные, например), которые уплотняются (как результат денатурации белка) при их прогревании в процессе стерилизации.

б. Полужидкие питательные среды содержат небольшое количество агара (примерно 0,5%).

б). Жидкие питательные среды не содержат уплотнителей. В принципе, любую жидкую среду можно превратить в плотную, или добавив к ней агар, или свернув содержащийся в ней белок (соблюдая в обоих случаях необходимую концентрацию уплотнителя).

2. По своему составу искусственные питательные среды классифицируются на натуральные и синтетические.

а) Натуральные искусственные питательные среды готовятся на основе отваров или экстрактов мяса, рыбы, овощей и др. натуральных продуктов. Натуральные питательные среды, свою очередь, классифицируют на простые и сложные. Именно преимущественно натуральные питательные среды используются в работе бактериологических лабораторий так называемого «практического здравоохранения».

1. Простые натуральные питательные среды, собственно, и представляют собой такие отвары или экстракты. К простым натуральным питательным средам относятся:

– мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), относящиеся к одной группе, так как агар не усваивается подавляющим большинством бактерий, и, следовательно, он не изменяет состав среды – только ее концентрацию;

– желатин;

– молоко;

– кусочки овощей.

2. Сложные натуральные питательные среды получают путем добавления в простые натуральные среды любого вещества (красителя, сахара, антибиотика, крови и т.д.).

б). Синтетические искусственные питательные среды получают, смешивая в растворе чистые химические вещества (как правило, соли). В отличие от натуральных питательных сред, это

так называемые среды известного состава, так как количество содержащихся в них веществ точно задается рецептурой их приготовления. Синтетические искусственные питательные среды используются в основном в бактериологических лабораториях научных учреждений.

3. По своему назначению искусственные питательные среды классифицируются на основные, элективные (селективные), дифференциально-диагностические и консервирующие.

а) Основные искусственные питательные среды названы так потому, что с их помощью проводится основная работа бактериолога – накопление чистой культуры, ее «оживление» после длительного хранения и т.п. Основные питательные среды, в свою очередь, подразделяются на универсальные и специальные.

1. Одна и та же универсальная основная питательная среда может быть использована для культивирования многих видов бактерий. По своему составу это – простые натуральные питательные среды. Бактерии, которые можно культивировать на таких средах, называются бактериями с простыми питательными потребностями.

2. Специальная основная питательная среда используется для культивирования конкретного вида или группы бактерий. Бактерии, которые для своего культивирования нуждаются в специальных питательных средах, называются бактериями со сложными питательными потребностями.

б) Элективные (селективные, избирательные, обогащенные) искусственные питательные среды – это среды, содержащие вещества, используемые бактериями определенных видов и не благоприятствующие или даже препятствующие росту других бактерий. Такие среды служат для выделения конкретного вида бактерий из патологического материала. Выделение тех видов бактерий, для которых такие среды не разработаны, довольно затруднительно.

в) Дифференциально-диагностические искусственные питательные среды – это среды, позволяющие отличать одни виды бактерий от других по их ферментативной активности (чаще всего – по цвету образуемых ими колоний) или культуральным свойствам.

г) Консервирующие искусственные питательные среды – это среды, используемые, например, при доставке патологического

материала в бактериологическую лабораторию; так как метаболическая активность на них бактерий сводится практически к нулю, то бактерии сохраняются, но не размножаются.

Контрольные вопросы:

1. Принципы культивирования микроорганизмов
2. Объясните понятие микроорганизмы – облигатные паразиты.
3. Объясните понятие микроорганизмы – факультативные паразиты.
4. Классифицируйте искусственные питательные среды по консистенции
5. Классифицируйте искусственные питательные среды по составу.
6. Объясните понятие простые натуральные питательные среды.
7. Объясните понятие сложные натуральные питательные среды
8. Объясните понятие элективные питательные среды.
9. Объясните понятие дифференциально-диагностические искусственные питательные среды

28. Приготовление препаратов из твердых и жидких бактериальных культур, простые способы окрашивания. Исследования на подвижность микроорганизмов

Окраска микроорганизмов, метод бактериологического исследования, применяемый для обнаружения и изучения микробов при микроскопировании препаратов. Последние могут быть приготовлены из культур микробов или нативного материала — тканей органов, крови, мокроты, мочи, фекалий, гноя, молока и других.

Окраска микроорганизмов — сложный физико-химический процесс, при котором существенную роль играют рН среды, адсорбция, капиллярные явления, электрические заряд и химический состав красителя и окрашиваемых объектов. Эти факторы определяют взаимодействие отдельных структур микробной клетки с тем или иным красителем.

На результаты окраски микроорганизмов оказывают влияние:

- физиологическое состояние микробов,
- способ приготовления препарата,
- метод окраски.

Красители делят на позитивные и негативные. *Позитивные* (основные) красители окрашивают клетки (при комнатной температуре в течение 30-60 секунд), *негативные* (кислые) – пространство, окружающее микроорганизмы. В результате клетки выглядят силуэтами на фоне красителя.

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;
- разведенный фуксин (фуксин Пфейффера) – это 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 % водный), применяемый при окраске бруцелл по Козловскому, при окраске спор.

Приготовление раствора фуксина Циля (карболовый фуксин). Кристаллы основного фуксина 5-10 г растворяют в 100 мл 96 ° этилового спирта. 10-20 мл готового насыщенного раствора соединяют со 100 мл дистиллированной воды для получения спирто-водного раствора. Добавляют 5 % фенола в качестве протравы.

Приготовление раствора фуксина Пфейффера. 10 мл фуксина Циля соединяют со 100 мл дистиллированной воды.

Приготовление генцианвиолета. 1 г сухого генцианвиолета растворяют в 10 мл спирта, добавляют дистиллированную воду. Берут листки фильтровальной бумаги 1х1 см и пропитывают ее получившимся раствором, высушивают на воздухе. При окраске его накладывают на мазок, наливают несколько капель воды и выдерживают 2-3 мин.

Приготовление раствора метиленовой синьки (синька Леффлера). 3 г краски настаивают 3-4 мес. в 100 мл 96 ° этилового спирта, затем 30 мл насыщенного раствора разбавляют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 1 мл 1 % раствора едкого калия (протрава), фильтруют.

Все краски представляют собой аморфные порошки или кристаллы. Анилиновые краски плохо растворяются в воде, поэтому вначале готовят насыщенные спиртовые растворы красок (1:10), из которых затем получают рабочие водные растворы.

Подготовка препарата состоит из нескольких этапов:

Приготовление мазка. На чистое обезжиренное предметное стекло петлей наносят материал. Если он жидкий, то каплю, взятую петлей, непосредственно равномерно распределяют по поверхности предметного стекла тонким слоем на площади примерно в 1 см². Если же изучается агаровая культура, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильной воды, в которой тонким слоем распределяется исследуемая культура. Получается так называемый мазок. Все манипуляции по приготовлению мазка необходимо выполнять с соблюдением правил асептики (над пламенем горелки стерилизуют петли, концы сосудов с исследуемым материалом, ватные пробки и пр.). Сделав мазок, его сушат при комнатной температуре, поместив на специальный сушильный столик. Хороший мазок после сушки должен давать едва заметный налет. Препарат с густым мазком для наблюдения малоприменен.

Для ускорения высыхания можно осторожно подсушить мазок над пламенем горелки. Предметное стекло в этом случае над пламенем горелки держат так, чтобы мазок был обращен вверх.

Фиксация мазка. Предметное стекло с высушенным мазком, обращенным вверх от пламени горелки, проводят 3-4 раза на границе между светлой и темной частью пламени. Цель фиксации - убить микробные клетки, прикрепить их к стеклу и облегчить

окрашивание. Мертвые клетки гораздо лучше воспринимают краску, чем живые. Препарат в общей сложности не должен находиться в пламени более 2 секунд. Излишнего нагревания мазков нужно избегать, так как при этом сильно изменяется структура клеток, мазок будет плохо окрашиваться. При недостаточной же фиксации мазка его можно смыть при последующей окраске. Практически достаточность нагревания определяют прикладывая предметное стекло к руке. При этом должен чувствоваться легкий ожог.

Исследование микробов в живом состоянии. Производят главным образом для изучения, их подвижности. Подвижность микробов изучают или в раздавленной, или в висячей капле.

На середину предметного стекла наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала. Культура должна быть выращена на жидкой питательной среде. Эту каплю осторожно накрывают покровным стеклом, чтобы в жидкости не образовалось пузырьков воздуха. Если имеется избыток жидкости, то его следует удалить фильтровальной бумагой. Препарат *"раздавленная капля"* позволяет установить форму клеток изучаемых микроорганизмов, их размеры, расположение, а также наличие или отсутствие подвижности. Препарат рассматривают иммерсионной системой микроскопа при слегка затемненном конденсоре.

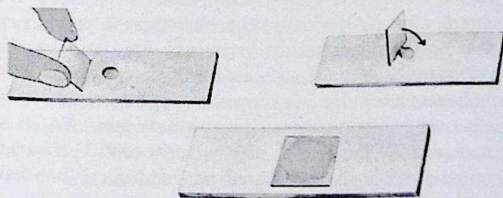


Рис.136. Этапы приготовления препарата «раздавленная капля».
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Висячая капля. Готовится на специальных предметных стеклах «с лункой». На покровное стекло наносят маленькую каплю суспензии из физиологического раствора и микробов. Эту каплю накрывают предметным стеклом с лункой, вокруг которой предварительно наносят тонкий слой вазелина. Покровное стекло

накрывают так, чтобы капля оказалась в центре лунки. Благодаря вазелину покровное стекло прилипает к предметному. После этого предметное стекло перевертывают, и капля оказывается висячей.

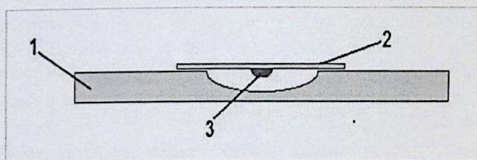


Рис.137. Препарат «Висячая капля». Заимствовано из Интернет-ресурсов

Установка висячей капли под микроскопом требует выполнения определенных правил, иначе покровное стекло будет раздавлено объективом.

Сначала при слабом увеличении (с опущенным конденсором и полузакрытой диафрагмой; отыскивают край капли, который ставя в центре поля зрения. В таком положении стекло закрепляется зажимами. После этого на покровное стекло наносят каплю кедрового масла, в которую под контролем глаза опускают иммерсионный объектив до соприкосновения со стеклом, и (подняв конденсор и усилив освещение частичным раскрытием диафрагмы) устанавливают в фокусе. Край капли позволяет быстро установить иммерсионный объектив в фокусе.

Методические указания по приготовлению препарата

Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло наносят петлей каплю физраствора и переносят в нее петлей из пробирки исследуемый материал. Получившуюся суспензию (взвесь) равномерно размазывают петлей на площади 1-2 см² по возможности более тонким слоем.

Если препарат готовят из жидкой питательной среды, берут каплю культуры петлей и, поместив каплю на середину сухого чистого стекла, равномерно размазывают.

Петлю после приготовления мазка прожигают над пламенем спиртовки.

Высушивание. Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе.

Фиксация. Фиксация препарата имеет целью:

- убить микробов и сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;
- прикрепить мазок к стеклу, чтобы он не смывался при дальнейших манипуляциях;
- сделать клетки исследуемых микроорганизмов более восприимчивыми к окраске, так как убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат трижды проводят над пламенем спиртовки, держа предметное стекло мазком вверх. Нельзя перегревать мазок, так как при этом могут произойти грубые изменения клеточных структур.

Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами (этиловым спиртом, метиловым спиртом, ацетоном).

Окраска. Окрашивание микробов не является механическим процессом проникновения краски в микробную клетку. Механизм окраски микробов следует рассматривать как процесс физико-химический, который зависит от физико-химического состава цитоплазмы микробных клеток.

Наиболее пригодным для окраски микробов оказались анилиновые краски, главным образом, основные и нейтральные. Кислые краски менее пригодны.

Анилиновые краски поступают в продажу в виде порошков, из которых в лабораториях готовят растворы. Сначала готовят насыщенные спиртовые растворы, сохраняющиеся впрок, но сами по себе не пригодны для окраски бактерий. Из них готовят разведенные растворы, которые и применяют для окраски мазка.

Способы окрашивания микробов делятся на *простые и сложные, или дифференциальные.*

Количество краски должно быть таким, чтобы покрыть всю поверхность мазка.

Простая окраска позволяет быстро и хорошо ознакомиться с общей морфологией грибов. При простой окраске обычно употребляется только одна краска, чаще всего красная - фуксин, или синяя - метиленовая синька.

- Фуксином Пфейфера красят мазок в течение 1-2 минут.

- Метиленовой синькой - в течение 3-5 минут.

По истечении срока окрашивания краску сливают с препарата

и промывают его водой. Оставшуюся на стекле воду осторожно удаляют фильтровальной бумагой. Окрашенный мазок должен быть совершенно сухим, так как остаток воды образует с кедровым маслом, нанесенным на мазок, эмульсию, мешающую микроскопированию.

1. Общие положения. Приготовление препарата из микробных культур в твердых и жидких средах

2. Микроскопирование и зарисовывание приготовленного препарата

3. Исследование микроба в живом состоянии

Перечень необходимых для работы оборудования и материалов включает спиртовку, бактериологическую петлю, шпатель, пробирки, чашка Петри со средой.

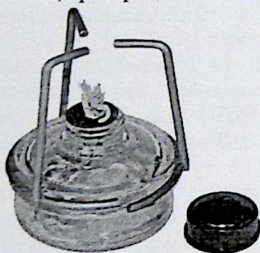


Рис.138. Спиртовка

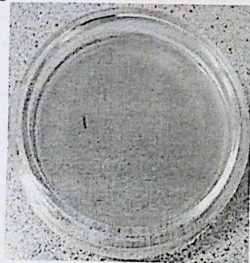


Рис.139. Питательная среда в чашке Петри



Рис. 140.
Бактериологические
петли



Рис.141.
Петледержатели

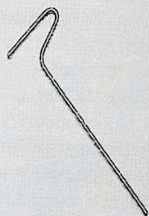


Рис.142. Шпатель

Контрольные вопросы:

1. Что такое микроскопический метод исследования микроорганизмов?
2. Какие виды препаратов используются для микроскопического исследования?
3. Каково значение красителей для микроскопического исследования?
4. Какие виды красок вы знаете?
5. Чем отличаются основные и кислые красители?
6. Из каких этапов состоит приготовление препарата?
7. Для чего проводится фиксация препарата?
8. Опишите технику приготовления препарата «висячая капля».
Для каких целей используется данный препарат?
9. Опишите технику приготовления препарата «раздавленная капля».
Для каких целей используется данный препарат?

29. Сложные методы окраски

Окраска мазков. В лабораторной практике пользуются простыми и сложными методами окраски микробов. Сложные, или дифференциальные, способы окраски, как уже указывалось, применяются для детального изучения структуры клеток.

При *простом методе окраски* препаратов на фиксированный мазок наливают несколько капель какого-либо красящего раствора (метиленовой сини, разведенного фуксина и пр.). Для получения более чистых препаратов рекомендуется красящий раствор наливать на отрезок фильтровальной бумаги, которой покрывают мазок. Раствор краски в среднем выдерживают на мазке 2-3 мин (в зависимости от вида краски). Фуксин красит интенсивно, причем окрашиваются одинаково хорошо все виды бактерий. Продолжительность окрашивания раствором фуксина вполне достаточна на протяжении 1-2 мин. Щелочную метиленовую синь оставляют для окрашивания мазка на 2-3 мин. Она красит менее сильно, но препарат получается более изящный, к тому же различные бактерии приобретают окраску различной интенсивности. При окраске метиленовой синью у крупных клеток

(например, дрожжевых) дифференцируется ядро и цитоплазма. Раствор генцианвиолета держат для окраски 3-5 мин.

По истечении указанного срока краску сливают с предметного стекла. Если на мазок помещалась фильтровальная бумага, ее нужно осторожно снять пинцетом и затем промыть мазок легкой струей дистиллированной воды (можно и водопроводной). Струю воды следует направлять на ребро предметного стекла, а не на мазок. Промытый препарат высушивают на воздухе при комнатной температуре или с помощью полосок фильтровальной бумаги.

На сухой мазок наносят каплю кедрового масла. Не следует кедровое масло наносить на влажный (а тем более на мокрый) мазок. При этом возникает эмульсия воды в кедровом масле и четкость изображения в микроскопе резко снижается.

Сущность *сложных методов окраски* заключается в том, что препарат окрашивают не одной, а двумя и большим количеством контрастных красок. В микробиологической практике сложный метод окраски микробов по Граму имеет весьма важное значение при дифференциации микробов.

Сложные способы окраски бактерий основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для детального изучения структуры клеток, а также для характеристики и дифференциации микроорганизмов.

Окраска по Граму. Все бактерии по отношению к этому методу разделяются на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Отношение к окраске по Граму является настолько важным опознавательным признаком, что обязательно упоминается в их характеристике.

Сущность этого метода в том, что микробы, цитоплазма которых содержит магниевую соль рибонуклеопротеида (белок находится в соединении с рибонуклеиновой кислотой) окрашивается по Граму положительно. РНК в этом случае образует с генцианвиолетом и йодом нерастворимый комплекс, это соединение не обесцвечивается спиртом, сохраняется фиолетовая окраска (микробы окрашиваются в цвет генцианвиолета).

У других видов микроорганизмов, не содержащих магниевую соль РНК, прочного соединения с генцианвиолетом не образуется, клетки легко обесцвечиваются спиртом и при дополнительной окраске раствором фуксина Пфейфера легко ограничиваются в розово-красный цвет (граммотрицательные).

Микробы с положительным окрашиванием по Грамму	Микробы с отрицательным окрашиванием по Грамму
По химическому составу	
1. Содержание пептидогликана (муреин) в клеточной оболочке составляет 80-90%	1. Содержание пептидогликана (муреин) в клеточной оболочке составляет 10-20 %
2. Содержат тейхоевую кислоту	2. Не содержат тейхоевую кислоту
3. Не содержат липополисахариды	3. Содержат липополисахариды
По составу	
1. Они состоят из одного слоя	1. Они состоят из трёх слоев
2. Толстый, мягкий, рыхлый	2. Тонкий, твердый, плотный

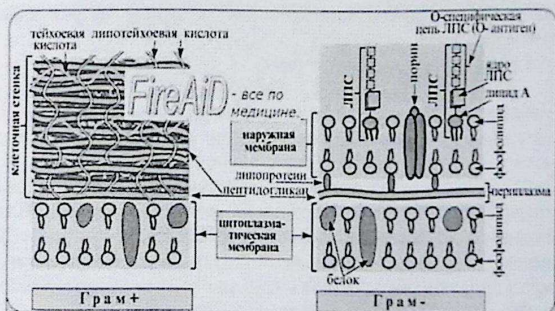


Рис. 143- Схема строения оболочек грамположительных и грамотрицательных бактерий
Займствовано из Интернет-ресурсов

Техника окраски микробов методом Грама состоит в следующем. На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый раствор генцианвиолета на 1-2 мин. Затем краску сливают. Сняв бумажку и не промывая препарат водой, наносят на мазок раствор Люголя также на 1-2 мин (мазок чернеет). По истечении указанного

времени раствор Люголя сливают с предметного стекла и погружают стекло в стаканчик со спиртом для обесцвечивания. Предметное стекло слегка покачивают в спирте, выдерживая 30-60 сек. Быстро промывают мазок водой и дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 1-2 мин. Фуксин сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Выполнить окраску микробов по Граму можно, пользуясь модификацией этого метода, предложенной Синевым. Вместо раствора карболового генцианвиолета используют фильтровальную бумагу, пропитанную этим раствором и высушенную. На фиксированный мазок накладывают полоску такой бумаги, наносят несколько капель стерильной воды, так чтобы бумажка оказалась смоченной, и окрашивают препарат в течение 2 мин. Затем бумажку снимают, на препарат наливают раствор Люголя и далее поступают так же, как указано выше при окраске по Граму.

Микроскопическая картина

Грам положительные микробы (Г+) окрашиваются в темно-фиолетовый цвет.

Грам отрицательные микробы (Г-) – в красный цвет.

Методика окраски по Граму (модификация Лоурейро)

На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианвиолета на 3 минуты. Краску сливают вместе с бумажкой (не промывать водой), наносят на препарат йодированный спирт на 30 секунд. Промывают водой. Дополнительно окрашивают фуксином Пфейфера в течение 2 мин. Сливают краску, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина:

Грамположительные микробы - темно-фиолетового цвета.

Грамотрицательные микробы - красного цвета.

Окраска по Циль-Нильсену, Михину и окраска спор по Мюллеру

Окраска кислотоустойчивых (спиртоустойчивых) бактерий. Некоторые виды бактерий, как, например, возбудитель туберкулеза, паратуберкулеза крупного рогатого скота и некоторые кислотоустойчивые сапрофиты, встречаемые в масле, молоке, в содержимом кишечнике, с трудом поддаются окраске обычными

методами. Трудность окраски указанных бактерий объясняется тем, что в их протоплазме содержится значительное количество жировосковых веществ, которые препятствуют проникновению красящих растворов.

Кислото-спиртоустойчивые бактерии окрашивают специальными красками, позволяющими обнаруживать данные микробы в исследуемом материале и дифференцировать их от других видов бактерий.

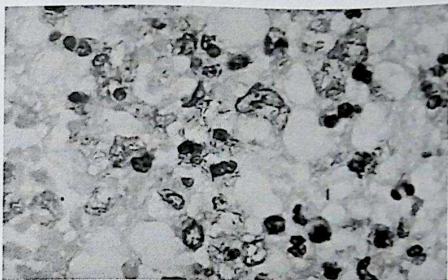


Рис. 144. *Mycobacterium tuberculosis* внутри клеток легкого. Окраска по Цилю-Нильсену. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Методика окраски по Цилю-Нильсену.

1. Приготовить мазок, высушить, зафиксировать.
2. Фиксированный препарат через полоску фильтровальной бумаги красят фуксином Циля при подогревании до появления паров и оставляют краску еще на 3-4 мин.
3. Снимают бумагу, препарат обесцвечивают 5%-ным раствором серной кислоты в течение 30 сек.
4. Промывают водой.
5. Дополнительно окрашивают синькой Леффлера – 3 мин.
6. Промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина.

Кислотоустойчивые бактерии окрасятся в красный цвет, остальные (некислотоустойчивые) — в синий.

Окраска спорообразующих бактерий

Некоторые виды микроорганизмов при неблагоприятных

условиях их существования образуют споры. Процесс спорообразования сопровождается значительной потерей бактериальной клетки свободной воды, уплотнением цитоплазмы. Спора образуется внутри бактериальной клетки в центре или на конце ее. Оболочка споры пропитана особыми смолистыми веществами, которые значительно снижают её проницаемость. Внутри одной микробной клетки образуется лишь одна спора, а из одной споры развивается одна бактериальная (вегетативная) клетка. Спорообразование у бактерий не является средством размножения, а имеет защитный характер – форма сохранения вида. Споры устойчивы к факторам воздействия окружающей среды.

Для окраски спор используют специальные сильнодействующие красящие растворы или применяют предварительное протравливание оболочек спор хромовой кислотой или другими средствами.

Существуют различные методы окраски спор, наиболее часто применяется окраска по Миллеру.

Методика окраски спор по Мюллеру.

1. Приготовить мазок, высушить, зафиксировать.
2. На мазок налить 5%-ный водный раствор хромовой кислоты на одну минуту.
3. Промыть водой.
4. Препарат через полоску фильтровальной бумаги красят фуксином

Циля, при подогревании до появления паров и оставляют краску еще на

3-5 минут.

5. Снять бумагу и обесцветить 5%-ным раствором серной кислоты в

течение 10 секунд.

- 6 Промыть водой.

7. Дополнительно окрасить синькой Леффлера – 3 минут.

8. Промыть водой и высушить.

Микроскопическая картина

Споры красятся в красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

Методика окраски капсул по Михину.

Капсульные бактерии окружены слизистым слоем. Слизь является продуктом жизнедеятельности цитоплазмы и выделяется

наружу через клеточную стенку. Если слизистый слой достаточно толст, прочен, имеет определенную форму и концентрируется вокруг бактериальной клетки, его называют капсулой. Капсула состоит из муцина и различных полисахаридов, у других из полипептидов. Капсулообразование у патогенных бактерий является выражением их защитной реакции. Будучи окруженные капсулой, они слабее фагоцитируются и устойчивы к действию антител.

У патогенных видов микробов капсула образуется, как правило, в инфицированном организме. Для исследования капсулообразующих бактерий готовят из исследуемого материала (кусочки органов, кровь павшего животного) мазки-отпечатки.

Методов окраски капсул несколько (метод Михина, Романовского-Гимза, окраска сафранином и др.).

Метод Михина.

Фиксированный препарат красят синькой Леффера, 5 минут.

Подогревают препарат над пламенем спиртовки до появления паров и выдерживают в горячем виде 5-7 мин. Промывают водой, быстро просушивают фильтровальной бумагой затем микрокопируют.

Микроскопическая картина:

Капсула – розовая, бактериальная клетка – синяя.

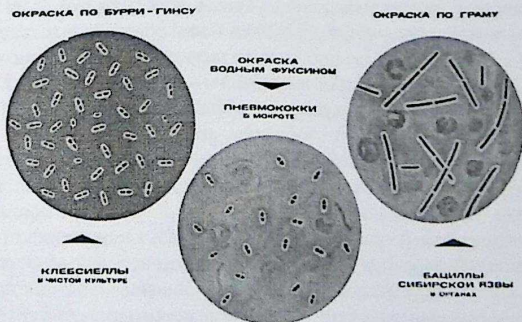


Рис.145. Методы выявления капсул у бактерий. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Контрольные вопросы:

1. Сущность дифференциально-диагностической окраски.
2. Сущность окраски по Граму.
3. Строение бактериальной клетки, спорообразование.
4. Сущность окраски по Мухину.
5. Сущность окраски по Мюллеру

30. Методы культивирования аэробных микроорганизмов. Методы получения чистых культур микроорганизмов

Основные методы культивирования

а) поверхностный метод - посев исследуемой культуры на плотные и жидкие среды. В этом случае микроорганизмы развиваются на поверхности среды и получают кислород непосредственно из воздуха. Для этого среды наливают в бактериологическую пробирку или в посуду с широким дном: чашки Петри, колбы Тартаковского и др.

б) глубинный метод - посев в жидкие среды в колбах и ферментерах. В этом случае микроорганизмы будут пользоваться только растворенным в среде (воде) кислородом. Настоящее время в лабораторной практике наиболее простой и очень распространенной способ глубинного культивирования - выращивание на качалках, обеспечивающие встряхивание или вращение колб со скоростью 100-200 и более оборотов в минуту.

В ферментеры воздух нагнетается компрессором или протягивается водоструйным насосом.

в) метод проточных культур по И. Малеку, М.Л. Утенкову и др.

При этом методе бактерии, выращиваемые в ферментерах находятся в непрерывно обновляемой среде, т.е. в условиях, возможно более близких к естественным. Культура непрерывно получает свежие питательные вещества, продукты обмена непрерывно удаляются, что дает возможность долгое время сохранять культуру без изменения ее физиологических свойств.

После посева культуру помещают в термостате. Термостат должен иметь постоянную температуру, соответствующую микробам, одинаковую в различных его частях. Постоянство температуры внутри термостата обеспечивается терморегулятором. Имеется много систем терморегуляторов. Любая система должна

обеспечивать автоматическое размыкание электроцепи и выключение тока при подъеме температуры выше заданной и включение при понижении температуры.

Для получения культуры возбудителей и изучения их особенностей и свойств их необходимо культивировать. С целью культивирования микроорганизмов исследуемый материал засевают на соответствующие питательные среды. Посев проводят, строго соблюдая правила асептики в стерильном боксе в некоторых случаях используют ламинарные боксы.

Бактериологический метод основывается на выделении чистых культур возбудителей из исследуемого материала, и их последующей идентификации на основании морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств.

- Популяция микроорганизмов, культивируемых на питательных средах называется *культурой*.

- Для изучения особенностей микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо выделить отдельные виды микроорганизмов, получить их чистую культуру и идентифицировать ее.

- Культура, состоящая из одного вида микроорганизмов называется *чистой культурой*.

Первый этап культивирования бактерий состоит в их посеве в питательные среды. Посев на бактерий на питательные среды проводят разными путями.

Инокуляцию исследуемого материала в питательную среду проводят при помощи бактериологической петли.

Для посева культур микробов используются плотные и жидкие питательные среды.

Посев на скошенный агар. Пробирку с чистой культурой и пробирку со стерильной средой берут в левую руку в наклонном положении так, чтобы пробирка с культурой была первой по отношению к работающему. В правую руку берут, как пишущую ручку, петлю и, держа ее вертикально, фламбируют в пламени горелки. Ватные пробки захватывают мизинцем и мякотью ладони правой руки, а также безымянным пальцем, зажимают и держат их во время посева в таком положении, но ни в коем случае нельзя класть пробирку на стол. Обжигают края открытых пробирок в пламени и вводят стерильную, петлю в пробирку с культурой и

прикасаются к поверхности культуры бактерий. Быстро и осторожно переносят петли в пробирку со средой, опускают, не доходя до границы конденсационной воды, и зигзагообразными движениями распределяют материал по скошенной поверхности агара. Извлекают петлю, обжигают края пробирок, закрывают обожженными пробками и стерилизуют петлю. На пробирке надписывают название культуры и дату посева.

Посев на жидкие среды. Техника посева на жидкие питательные среды в основном такая же, как и посева на скошенный агар, но при этом материал на петле растирают по стенке пробирки и смывают питательной средой путем встряхивания ее самой петлей. Нужно учесть следующие: не допускать, чтобы жидкость питательной среды выливалась при горизонтальном положении пробирки; следить, чтобы жидкость не смачивала краев пробирок и ватных пробок; при пересеве с жидкой среды на жидкую можно пользоваться петлей, стерильной градуированной пипеткой или стерильной пастеровской пипеткой. Капилляр пастеровской пипетки отламывают прокаленным пинцетом, слегка обжигают на пламени горелки, после чего пипетку вносят в посевной материал. Последний набирают в капилляр пипетки путем насасывания (следить, чтобы в открытом конце пипетки находилась вата), после чего отверстие пипетки быстро и плотно, зажимают указательным пальцем правой руки. Затем пипетку погружают в свежую питательную среду, куда и выдувается ее содержимое. После посева пипетки немедленно погружаются в дезинфицирующий раствор.

Методы получения чистой культуры аэробных бактерий. Для получения чистой культуры бактерий можно использовать различные методы

Наиболее часто используются методы, основанные на механическом разобщении микроорганизмов на поверхности или внутри питательной среды. Принцип этих методов основан на механическом разделении исследуемого материала в глубине или на поверхности питательной среды, с целью получения роста микроорганизмов в виде изолированных колоний.

Считается, что одна колония развивается из одной микробной клетки. И поскольку колония состоит из микроорганизмов одного вида, ее можно рассматривать как чистую культуру.

Метод Коха (метод разобщения микробных клеток в плотных питательных средах) Данный метод является одним из классических методов применяемых для получения чистой культуры. Исследуемый материал последовательно разводят в стерильном физиологическом растворе затем по одной капле из каждого разведения вносится в пробирку с расплавленным до 40°C агаром и перемешивается.

Содержимое каждой пробирки переносится в чашку Петри и инкубируется в термостате. После инкубации рост единичной колоний обычно наблюдается на чашке Петри, в которую добавляли материал с наименьшего разведения.

Метод Дригальского (метод разобщения микробных клеток на поверхности плотной питательной среды). Суть метода заключается в последовательном распределении исследуемого материала в несколько чашек Петри с питательной средой при помощи стеклянного шпателя или бактериологической петлей.

Посев исследуемого материала осуществляют на три чашки с мясопептонного агара. Для этого, на середину первой чашки пипеткой или бактериологической петлей вносят исследуемый материал, который затем распределяют стеклянным шпателем. Не стерилизуя, шпатель переносят во вторую, а затем в третью чашку проводя распределение оставшегося на его поверхности материала.

На второй день чашки Петри достают из термостата и приступают к изучению культуральных свойств бактерий.

Наблюдается последовательное разобщение микроорганизмов на средах в чашках, в которые производили посев по методу Дригальского. Обычно на поверхности среды во второй, или в третьей чашке наблюдается рост микроорганизмов в виде изолированных колоний

Метод инокуляции в секторы. В настоящее время с целью получения чистой культуры применяется метод посева на 4 сектора. Исследуемый материал вносят петлей в чашки Петри с питательным агаром и распределяют его штрихами. Дно чашки условно разделяют на 4 сектора. Первоначально материал засевают на первый сектор и проводят параллельные линии по всему сектору. Далее, прожженной петлей, не изменяя её положения по отношению к агару, производят штриховые посевы из 1-го сектора во 2-ой, таким же образом из 2 сектора в 3-ий и аналогично в 4 сектор.

После инкубации наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на питательной среде, и обычно в последнем секторе микроорганизмы растут в виде изолированных колоний. При посеве на 4 сектора, после инкубации чашек, наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на питательной среде и обычно в последнем секторе микроорганизмы растут в виде изолированных колоний. На данном этапе получения чистой культуры производится пересев изолированных колоний на другие питательные среды, и их последующая инкубация в течение 1-2 дней.

Используя метод инокуляции в 4 сектора на чашке Петри можно также получить предварительную информацию о количестве микроорганизмов в исследуемом материале. Так, рост определённых микроорганизмов только в 1-ом секторе оценивается как (+), в 1-ом и 2-ом как (++), в 1-ом, 2-ом и 3-ем секторах – как (+++), и соответственно как (++++) при росте во всех 4-ех секторах.

При учете результатов бактериологического исследования, в материале, количество которого трудно установить (н-р, материал взятый тампоном) количество микроорганизмов указывается в плюсах (+), в материале количество которого можно установить (н-р, моча, мокрота) определяют колониеобразующие единицы в мл (КОЕ/мл).

Контрольные вопросы:

1. Основные методы культивирования аэробов.
2. Что такое культура микроорганизмов
3. Что такое чистая культура микроорганизмов.
4. Метод посева бактерий на скошенный агар.
5. Метод посева бактерий на жидкие среды.
6. Методы получения чистой культуры аэробных бактерий.

31. Методы	культивирования	анаэробных
микроорганизмов.	Способы	создания
Микрофлора почвы		анаэробноза.

Методы культивирования анаэробов. Для культивирования анаэробов необходимо создать сниженное парциальное содержание кислорода в среде или в воздухе, с которым они соприкасаются, что

достигается различными способами.

Наиболее простой способ - посев анаэробной культуры уколом в высокий столбик сахарного агара.

Добавление в среду редуцирующих веществ. Чаще всего употребляется среда Китт-Тароцци - бульон с 0,5% глюкозы и кусочками свежих органов животных (или с мясным фаршем). Кусочки органов, а также глюкоза обладают редуцирующей способностью. Среду заливают сверху слоем вазелинового масла.

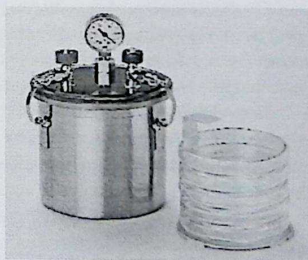
Питательные среды перед посевом анаэробов «регенерируют» - кипятят для удаления из них кислорода. После посева их заливают сверху слоем парафинового или вазелинового масла для разобщения от атмосферного воздуха.

Удаление воздуха (следовательно, кислорода) из среды механическим путем. Для этого пользуются особыми приборами - анаэростатами, из которых воздух выкачивается насосом. За неимением, анаэростатов используют эксикаторы.

Более старый способ - замена воздуха индифферентным газом например, водородом, который получается в аппарате Киппа и через присоединенную трубку поступает в сосуд, где помещены посевы анаэробов, вытесняя из него воздух с его кислородом.



Эксикатор



Анаэростат

Рисунок 146- Аппараты для культивирования анаэробов.

Заимствовано из Интернет-ресурсов

Механическая защита от кислородного воздуха. Удобен способ Виньяля- Вейона. Берут стеклянную трубку длиной около 30 см и шириной 3-6 мм. Один конец ее вытягивают в капилляр, а у другого

делают перетяжку, вставляют ватную пробку, засевают в растопленный агар исследуемый материал, перемешивают среду и затем насасывают агар в стерилизованную трубку. Затем запаивают капилляр и трубку помещают в термостат. Если посев был не слишком густой (рекомендуют делать несколько разведений), то в среде вырастают ясно видимые снаружи колонки бактерий, которые можно извлечь, распилив трубку.

Химическое поглощение кислорода воздуха, например щелочным раствором пирогаллола (10% растворы щелочи и пирогаллола), в особых пробирках.

Биологический метод - комбинированный посев культуры анаэробов и аэробов (способ Фортнера). Посев производят на чашку с толстым слоем кровяного агара, разделенного пополам вырезанной посередине чашки прокаленным стерильным скальпелем небольшой полоской агара. На одной половине агара делают посев культуры аэробов, например *Bact. prodigiosum*, на другой - посев анаэробной культуры. Чашку обмазывают парафином и помещают в термостат. Сначала происходит рост аэробов. Когда же они в достаточной мере исчерпают из чашки кислород, начинается рост анаэробов.

Среды для культивирования анаэробов.

Среда Китт-Тароцци и сахарный кровяной агар Цейслера. Анаэробноз на среде Цейслера создается различными способами: физическим, химическим, биологическим и комбинированным.

Методы получения чистой культуры анаэробных бактерий

Метод Вейнберга. Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку с 0,9% изотоническим раствором. Перемешивают и переносят в пробирку с охлажденным до 45-50 градусов сахарным агаром, разлитым в пробирки высоким столбиком. После перемешивания содержимое пробирки засевают еще в две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей воды.

Выросшие в глубине питательной среды через 24-72ч. колонии пересевают на среду Китта-Тароцци или другие среды для анаэробов с целью выделения чистой культуры.

Метод Цейслера. Исследуемый материал инокулируют в секторы на поверхности плотной среды. Инкубируют в анаэробных условиях при 37°C 24-72ч.

Выросшие на поверхности питательной среды колонии пересевают на среду Китта-Тарощи или другие среды для анаэробов для выделения чистой культуры/

Контрольные вопросы:

1. Основные методы культивирования анаэробов.
2. Какие способы защиты существуют для анаэробов от кислорода воздуха?
3. Среда для культивирования анаэробов.
4. Методы получения чистой культуры анаэробных бактерий

32. Микрофлора воздуха

С точки зрения ветеринарно-санитарной микробиологии воздух рассматривается в двух случаях: 1. Атмосферный воздух 2. Воздух в здании (помещения, общественные помещения, помещения).

1. Общие положения Атмосферный воздух-среда, неблагоприятная для жизнедеятельности микроорганизмов. В нем микроорганизмы могут встречаться только временно. Здесь воздух, как и вода, обладает самоочисткой. В ней микрофлора варьируется в зависимости от погодных условий: А) безветренные, открытые, в теплые дни в воздухе в основном подвергаются пигментообразующие бактерии, так как они благодаря пигментам устойчивы к ультрафиолетовым лучам солнца, а другие микроорганизмы умирают. Б) в ветреные, бурные дни можно встретить микроорганизмы, обитающие в воздухе, сопровождающихся пыле-почвой. Это: актиномицеты, микроки, сарцины, аэробные, анаэробные спорообразующие переполненные гнили бактерии, грибы и др. в. В) в дождливые дни пыль в воздухе подавляется, воздух удаляется от сопровождающих их микроорганизмов. При этом в воздухе можно больше полусотни грибов плесени и дрожжей, которые любят влагу.

2. Микрофлора воздуха в помещении состоит из кокков (шарообразных) и микроорганизмов, соприкасающихся с поднятой пылью, встречающихся в них обитателей (людей и животных). В

нем отсутствует возможность самочувствия воздуха как атмосферного воздуха, поэтому степень загрязнения микробами зависит от его проветривания и очистки.

Так как возбудитель многих инфекционных, паразитарных заболеваний распространяется по воздуху (медь.: микроклимат, вызывающий туберкулез, грипп, заболевания глаз, кожи и т. д. б.) необходимо определить воздушную микрофлору в здании и дать санитарную оценку. Как выяснилось экспериментом, загрязнение микробами воздуха в не проветриваемом, не обтиранном влажной тряпкой было в 30 раз больше, чем в проветриваемом и обтиранном помещении. В случае, если в местах массового скопления людей или животных не соблюдаются необходимые санитарно-гигиенические меры, увеличивается вероятность заражения возбудителями различных заболеваний.

При исследовании бактериальной загрязненности воздуха учитывается общее количество микробов, содержащихся в определенном объеме воздуха и качественный состав микрофлоры. Имеются несколько способов микробиологического исследования воздуха, но не простым из них является метод оседания (седиментационный) микробов по Коху.

Метод оседания микробов по Коху. Чашки Петри с МПА оставляют открытыми в скотных дворах (или других помещениях) на 20 минут, затем закрывают крышкой, помещают в термостат на 1-2 суток при температуре 37°C.

По количеству выросших колоний судят о степени загрязнения воздуха микроорганизмами.

Метод оседания не является совершенным, так как применяемая среда не для всех видов микроорганизмов является пригодной (пример, возбудитель туберкулеза растет только на специальных средах - яичных, глицериновых, на картофеле). Этот метод позволяет только приблизительно определить количество микробов в единице объема воздуха.

Так, по Омелянскому, на поверхности питательной среды площадью 100 см в течение 5 минут оседает столько микробов, сколько их содержится в 1 м³ воздуха.

Однако при одинаковой экспозиции открытых чашек и равных площадях метод оседания позволяет относительно правильно судить о микробном загрязнении воздуха в

исследуемом помещении. Более точное определение количества микробов в воздухе осуществляется посредством аппарата Кротова.

Контрольные вопросы:

1. Микрофлора воздуха.
2. Методы определения микрофлоры воздуха (общее количество и наличие патогенных микробов).
3. Значение воздушной микрофлоры.

33. Микрофлора воды. Определение ОМЧ, коли-титра и коли-индекса воды

Вода - естественная среда обитания для многих микроорганизмов. Из пресных и соленых вод являются представителями всех таксономических групп: бактерии, простейшие, грибы, микроскопические водоросли и вирусы. На качественный показатель микрофлоры в воде, конечно, влияет ее происхождение: поверхностные, подземные, атмосферные и солевые воды. Водную микрофлору составляют две группы: аутохтонные и аллохтонные микроорганизмы.

-*Аутохтонная микрофлора* - совокупность микроорганизмов, способных постоянно выживать и размножиться в воде. В них встречаются шары, палочки и зигзаки.

-*Аллохтоновая микрофлора* - совокупность микроорганизмов, которые случайно сталкиваются с водой, в которой живет только короткое время.

-Основной путь загрязнения открытых водоемов - слияние неочищенных производственных отходов и сточных вод.

-Микрофлора сточных вод состоит из микробов, обитающих в кишечнике людей и животных. Они могут быть умеренными или условно-опасными; в его состав также могут входить последствия (возбудители кишечных инфекций, туляремии, иерсиниозов, лептоспирозов, полиомиелита, гепатита А).

-Загрязнение водоемов микробами происходит также при купании или стирке людей. В воде бассейнов можно встретить бактерии группы кишечной палочки (ИВТ), энтерококки,

стафилококки, нейссерии, пигментообразующие, спорообразующие бактерии, грибы и другие микроорганизмы (вирусы и простейшие).

-Основной способ самоочищения воды-взаимная конкуренция сапрофитной микрофлоры, т. е. самоочищенная микрофлора воды, которая поступает с внешней стороны органических веществ (древесина, листья, слюна, навоз, кал и др.), в результате активного разложения приводит к уменьшению «посторонних» бактерий, которые прилипают к ним. В зависимости от степени загрязнения воды различают полисапробные, мезосапробные и олигосапробные зоны.

-*Полисапробная зона* (сильно загрязненная зона) характеризуется большим количеством легко распадающихся органических веществ и слишком низким содержанием кислорода. Такая зона характеризуется разнообразием микробного биоценоза, но большинство из них, конечно, анаэробы, грибы и актиномицеты. В этой зоне количество бактерий в 1 мл воды составляет 1 млн и выше.

-*Мезосапробная зона* (умеренно загрязненная зона) характеризуется явлениями окислительно-восстановления и активного разложения органических веществ. Состав: нитрифицирующие, аэробные бактерии, а также клостридии, псевдомонасы, микобактерии, стрептомицеты, грибы, встречающиеся в воде и др. б. В 1 мл воды встречаются сотни тысяч бактерий

-*Олигосапробная зона* (чистая зона) характеризуется завершением самоочистки, остатками небольших органических соединений и завершением явления минерализации. Вода полностью очищена. В 1 мл воды в этой области содержится только 10-1000 бактерий. В этом регионе разрушаются все опасные микробы.

Методические указания для определения водной микрофлоры.

Загрязнение воды устанавливают определением *общего микробного числа (ОМЧ)*, что является количеством общим количеством микробов в 1 мл (КОЕ).

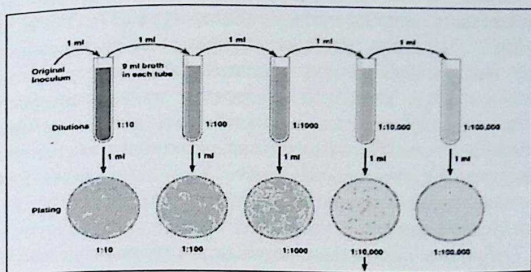


Рис.147. Метод серийных разведений. Заимствовано из Интернет-ресурсов

Исследуемую воду, в зависимости от степени загрязнения разводят стерильной водопроводной водой 1:10, 1:100 и т.д. (метод серийных разведений).

Методика выполнения:

1. Тщательно перемешивают пробу воды и стерильной пипеткой с помощью дозатора вносят по 1мл в две стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Этой же пипеткой вносят 1мл исследуемой воды в пробирку со средой для приготовления первого разведения – 1:10.

2. Стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки первого разведения и из нее производят посев по 1мл в две стерильные чашки и в следующую пробирку со стерильной средой для приготовления следующего разведения – 1:100.

3. Аналогично выполняют посев следующих разведений, количество которых определяется исходя из предположения о возможном загрязнении воды. Как правило, на чашку Петри засевают 1 мл и 0,1мл воды. Если вода заведомо грязная, делают несколько разведений и из каждого разведения засевают по 1мл.

4. После внесения воды в каждую чашку вносят 8...12мл расплавленной и остуженной до (44...48)°С агаризованной питательной среды, быстро перемешивают круговыми движениями содержимое чашек, равномерно распределяя питательную среду по всему дну. Чашки Петри оставляют на 10...15 минут для застывания среды.

5. После застывания среды чашки Петри с посевами помещают

в термостат и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 2) ч.

6. После инкубирования учитывают чашки Петри, в которых выросло от 10 до 300 колоний. Подсчитывают колонии, выросшие как на поверхности, так и в глубине агара и видимые при увеличении в два раза. Количество колоний на обеих чашках с параллельными разведениями суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониесобразующих единиц (КОЕ) в 1 куб.см исследуемой воды

7. Сравнив полученные результаты с нормативными, делают вывод о качестве исследованной воды.

При обильном росте (200 и более колоний) следует использовать аппарат для автоматического счета колоний. Число выросших колоний примерно соответствует количеству микроорганизмов в засеянном объеме воды. Для получения среднего арифметического показателя следует сосчитать число колоний, выросших в каждой чашке, и затем умножить на соответствующее разведение. Результаты подсчитанные по отдельным чашкам, нужно сложить и затем разделить на количество засеянных чашек. Полученное число и будет являться показателем общей микробной загрязненности воды (*ОМЧ – общее микробное число*).

- Водопроводная вода не должна содержать более 100 колоний в 1 мл.

- *Определение коли-титра воды.* Индикатором свежего фекального загрязнения воды является кишечная палочка, как постоянный обитатель кишечника. Результаты обнаружения кишечной палочки в воде регистрируются в виде *коли-титра* и *коли-индекса*.

Коли-титр определяется количеством воды, в котором содержится одна кишечная палочка. **Коли-индекс** - количество особой кишечной палочки, которое содержится в 1 л воды.

В настоящее время в соответствии с ГОСТ 5216-50 титр кишечной палочки определяется методом мембранных фильтров.

Метод мембранных фильтров. Этот метод используется при достаточно чистой воде, свободной от посторонних примесей. Фильтры представляют собой нитроцеллюлозные кружочки диаметром 35 мм. Различают крупнопористые и мелкопористые фильтры (№ 1, 2, 3, 4, 5). Для фильтрации воды рекомендован

фильтр № 3. Перед фильтрованием фильтр помешают в дистиллированную воду температуры 50-60° и кипятят 2-3 раза по 10-15 минут с обязательной сменой воды. Обработанный таким образом фильтр кладут на стерильный столик аппарата Зейтца. Воду фильтруют через стерильную воронку. Фильтрация проводится с помощью аппарата Комовского. Водопроводную воду фильтруют в количестве 300-500 мл. По окончании фильтрования фильтр снимают стерильным пинцетом и накладывают на среду Эндо в чашку Петри. Чашки помещают в термостат на 24 часа, подсчитывают количество выросших колоний, типичных для кишечной палочки. Выборочно из 2-3 колоний делают мазки и красят по Граму.

Учет результатов исследований проводят по следующему примеру. Например, было профильтровано 500 мл воды. На фильтре выросли 2 типичные для кишечной палочки колонии. Следовательно, коли-титр равен 250 мл, а коли-индекс - 4.

Общие положения. Исследование посевов на питательных сред, пересев которых делали в предыдущем занятии. Обратите внимание на свойства культуры. Микроскопирование.

Санитарно-биологическая характеристика воды.

Для этого:

А) определение общего количества микробов (определение количества микробов в 1 мл воды)

Б) определение коли-титра и коли-индекса (указать) с использованием мембранного фильтра.

Отбор проб воды из открытых водоемов

Поверхностные пробы отбирают с глубины 10-30 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. Придонные пробы отбирают с глубины 30-50 см от дна.

Пробы воды рекомендуется отбирать специальным батометром, предназначенным для этих целей, например:

- поверхностные пробы отбирают батометром, состоящим из штанги длиной около 1 м, к которой прикрепляется площадка для установки стерильной емкости для отбора проб и подвижное устройство для крепежа емкостей разных размеров;

- глубинные пробы отбирают батометром, состоящим из платформы с грузом, к которой прикрепляется стерильная емкость для отбора проб с пробкой (при этом пробка открывается с

помощью прикрепленной к ней веревки при достижении нужной глубины).

Батометр (греч. bathos — глубина и metron — мера) — гидрологический прибор для взятия проб воды с различных глубин водоёма.

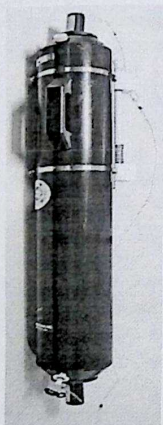


Рис. 148. Батометр Нискина
Заимствовано из Интернет-ресурсов



Рис. 149. Батометр.
Заимствовано из Интернет-ресурсов

Допускается использование других систем, например специального устройства, состоящего из стеклянной емкости под вакуумом, которая оснащена резиновой пробкой и стеклянной трубкой, запаянной и закрепленной недалеко от троса. Когда емкость для отбора проб находится на необходимой глубине, по тросу посылается груз, он разбивает трубку, и емкость заполняется водой.

При отсутствии специального батометра чистую стерильную емкость для отбора проб вводят вверх дном в воду на заданную глубину и заполняют емкость водой, поворачивая ее в разные стороны. При наличии потока воды емкость следует держать против течения (вверх по течению). Если в местах купания глубина

воды менее 1,0 м, то допускается отбирать пробы на меньшей глубине, о чем указывают в актах отбора проб. Следует принять меры к минимизации взмучивания донных отложений.

Контрольные вопросы:

1. Что такое аллохтонная и аутохтоновая микрофлора?
2. Какие зоны различают по степени загрязнения открытых источников воды?
3. Что называют Coli-титром и Coli-индексом?
4. Как определяют общее количество бактерий в воде?
5. Как проводится серийное разведение пробы воды?
6. Как проводится санитарная оценка вода?
7. Какие оборудования используются для отбора проб воды из открытых водоемов?

34. Микрофлора животного организма и кормов

Метод исследования силоса. Небольшое количество силоса хорошо натирают на фарфоровой ножке и выливают на стерильный физиологический раствор (1: 5) / платину с такой массой силоса, чтобы сформировать подложку на стекле. Препарата сушат, фиксируют, окрашивают (метод Грама) и затем просматривают под микроскопом.

Микроскопические исследования дают приблизительное представление о количестве и морфологическом строении микробов.

Микроскопия дрожжевого корма. Для бактериологического исследования дрожжевого корма для животных образец втирают в фарфоровую посуду с соотношением 1: 10 / физиологический раствор и затем фильтруют через 2-3 слоя марли (центрифугируют для отделения гранул). Готовят мазок из полученного остатка, а затем красят в синий цвет Леффлера в течение 3-5 минут, микроскопируют. Можно приготовить мазок сразу из дрожжевой пищи без предварительной обработки.

Микрофлора продуктов животного происхождения.

В ходе исследований особое внимание следует уделить количеству и качеству микрофлоры молока. Это позволяет нам организовать правильную борьбу с повреждением молока при различных возбудителях. Несоблюдение санитарных требований может привести к появлению кишечных бактерий, жирных кислот, гнилостных аэробных и анаэробных бактерий, грибов дрожжей и плесени, вызывающих повреждение молока и молочных продуктов. Определение общего количества микроорганизмов. При определении общего количества микроорганизмов рекомендуются следующие показатели разбавления молока: сырое молоко - 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000, пастеризованное молоко - 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000. 1 мл стерильной пипетки берут во флакон, содержащий 8 мл стерильной воды. Затем мы получаем разведение 1:10. С помощью стерильной чистой пипетки разведем 1:10 разбавленную среду, берем 1 мл и нужен 9 мл стерильной воды во флакон. Затем получается разбавление 1:100. Это будет продолжаться до тех пор, пока не будет получено требуемое разбавление. Обычно молоко следует разбавлять в 6-7 раз. Берут 1 мл соответствующего разведения в чашку Петри и налём в нее 15-15 мл охлажденного до 45 ° С агара. Смесь тщательно перемешивают встряхиванием и агар замерзает на плоской поверхности. Чашки выдерживают в термостате 37 ° С в течение двух дней. Чтобы определить общее количество бактерий, необходимо выбрать уровень разведения, который увеличился не менее чем на 50, но не более чем на 300 колоний. Каждая из подсчитанных колоний отметят чернилами. Когда количество колоний велико, используют аппарат для подсчета колонии. Для этого разделить нижнюю часть чашки на несколько секторов и считают колонии в секторах 2-3 (не менее 1/3 поверхности ветви), найти среднее арифметическое число колоний и умножить их на количество всех секторов.

Таким образом, находят общее количество колоний, выросших на одной чашке Петри.

Чтобы определить общее количество бактерий, необходимо умножить количество 1 мл колонии до соответствующего уровня разведения. Добавляют результаты, полученный от каждого этапа, и делят его на количество чашек. Затем производят среднее арифметическое число. Это конечный результат.

Контрольные вопросы:

1. Микрофлора корма.
2. Методы определения микрофлоры корма (общее количество и наличие патогенных микробов).
3. Микрофлора продуктов животного происхождения.

35. Серологические исследования. Виды серологических реакций

Реакция агглютинации

Иммунобиологические реакции возникают в живом организме при внедрении в него живых или мертвых антигенов (большей частью микробов) продуктов их жизнедеятельности (токсинов), или продуктов распада их. Основу всех иммунобиологических реакций составляет специфическое взаимодействие антигена с антителом.

Реакция агглютинации (РА)

На основании постановки иммунобиологических реакций, возможно, довольно точно установить или присутствие в организме возбудителя заболевания по наличию в сыворотке крови больного и переболевшего специфических антител для данной инфекции, или, если выделена от больного культура неизвестного возбудителя, определить ее характер.

Губер и Видаль установили, что в сыворотке больного организма, под влиянием инфекции или искусственного введения антигена в виде живых или убитых бактериальных тел, обнаруживаются вещества, которые скучивают тела микробов и тем лишают подвижных из них подвижности. Эти антитела были названы авторами агглютинидами.

Прибавление агглютинирующей сыворотки к бактериальной эмульсии через несколько часов вызывает просветление эмульсии и образование хлопьев, состоящих из кучек (склеенных) микробов, осевших на дно пробирки.

Техника постановки РА (на бруцеллез)

У подозрительных по бруцеллезу животных берут из яремной вены кровь в стерильные пробирки, ставят минут на 15 в теплое место. Полученный сгусток фибрина и форменных элементов крови обводят металлической или стеклянной палочкой и ставят на ночь в

холодильник. Отстоявшуюся сыворотку сливают в стерильные пробирки. Если же в лабораторию присланы для исследования кровь, то ее в первую очередь проверяют на пригодность (отстой, отсутствие гемолиза и загнивания); сверяют номера сывороток с номерами ведомости; приготавливают консервирующее вещество (5% раствор карболовой кислоты на физиологическом растворе), консервант добавляют в слитые сыворотки из расчета 1:10.

РА на бруцеллез КРС ставится на физ. р-ре в обычных бактериологических пробирках. На каждую сыворотку по 4 пробирки (разведение в первой пробирке 1:50, во второй – 1:100, в третьей – 1:200, в четвертой – 1:400).

1. Общие положения Физиологический раствор переливают в первую пробирку по 1,96 см³, во вторую, третью, четвертую по 1 см³.

2. В 1 пробирку тщательно перемешивают исследуемую сыворотку 0,04 см³, при этом снимают разбавление 1: 50.

3. Из этой пробирки снимают 1 см³ раствор во второй и хорошо перемешивают, при этом снимают разбавление 1: 100.

4. Из второй пробирки 1 см³ раствор переливают в третью пробирку и хорошо перемешивают. Тогда получается 1: 200 разбавлений.

5. Из третьей пробирки раствор 1 см³ заливают в четвертую пробирку хорошо перемешивают. Тогда получается 1: 400 разбавлений.

6. Из четвертой пробирки высыпают 1 см³ раствора.

7. Во все пробирки переливают антиген по 0,05 см³.

8. С такой степенью разбавления ставят как вариант контроля заранее известных положительных и отрицательных сывороток, антиген помещают в физиологический раствор.

9. Штативы, в которых размещены пробирки, помещают в термостат с температурой 37°C на 2-4 часа. После этого выдерживают сутки при комнатной температуре.

Читка РА и запись ее результатов.

Перед читкой проверяют контроль. Читать реакцию нужно на темном фоне или прикладывая дно пробирки к зеркальцу, что дает обратное отражение дна пробирки. За положительные признаны сыворотки имеющие осадок антигена на дне пробирки в виде пуговки. При встряхивании получается равномерная эмульсия.

Очень положительную реакцию -	+ + + +
Общая положительная реакция - + + +	
Подозрительную реакцию - + +	
Очень подозрительную реакцию - «+»	
Отрицательную реакцию обозначают -	«-».

Реакция преципитации (РП)

Преципитины или осаждающие белок вещества, подобно агглютиниnam, образуются под влиянием повторных инъекций растворов белка или бактериальных культур. Преципитины также специфичны. Если сыворотку иммунного животного смешать с раствором белка, которым велась иммунизация или с фильтратом бульонной культуры то в растворе белка или бактериальном фильтрате, появляется белковый осадок.

Реакция преципитации весьма чувствительна и точна для определения белков различного происхождения; поэтому она получила широкое применение в судебной медицине и гигиене пищевых продуктов. В судебной медицине она применяется для выяснения природы кровяных пятен, для решения вопроса о том принадлежит ли данная кровь человеку или животному. В судебной медицинской практике в этом применении реакция преципитации носит название реакции Уленгута.

Приготовление преципитирующей сыворотки. Кролику внутривенно или внутрибрюшинно вводят слегка подогретую человеческую кровь 4-5 раз с промежутками в 2-3 дня. После этого стерильно берут у кролика кровь, получают сыворотку и разливают по ампулам. Таким же образом можно приготовить сыворотки, обладающие преципитирующими свойствами по отношению к крови любого животного.

Приготовление экстрактов из кровяных пятен. Подозрительное пятно с твердого предмета соскабливают и растворяют в физиологическом растворе. Или испачканные ткани нарезают мелкими кусочками и вымачивают в физ. растворе, свежие пятна в течении нескольких часов, а старые в течении суток.

Огромное значение реакция преципитаций имеет, когда ни один из методов диагностики не приводит к цели (например, при сильном разложении трупа).

Асколи и Валенти установили, что экстракты из сибиреязвенных культур, тканей и органов (кровь, мышцы, селезенки, кожи и пр.) дают реакцию преципитации с высоко активными преципитирующими (антисибиреязвенными) сыворотками. При пересылке последней экстендом через несколько минут или моментально появляется на границе соприкосновения двух жидкостей пренипитационное кольцо в виде серо-белого белкового выпада. Появление кольца диска более чем через 15 мин. не считается характерным. Они установили так же, что экстракты очень устойчивы к кипячению и так их можно получать из органов павших животных. Этот метод называется термопреципитационным. При пересылки материала для исследования его консервируют глицерином, спиртом и это не препятствует постановке реакции преципитации.

Способ кипячения по Асколи и Валенти. Берут от подозрительного по сибирской язве трупа кусочек селезенки, величиной с горошину и растирают с 70 мл физиологического раствора и держат пробирку несколько минут в кипящей воде; 2 раза фильтруют. Экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Шутц и Пфейлер. (Хлороформенный метод) кусочки сомнительного материала с орех растирают в ступке с 10 г белого песка в равномерную эмульсию. Помещают в цилиндр с притертой пробкой, куда налит хлороформ и выдерживают часов пять - хлороформ разрушает гемоглобин. Хлороформ сливают, затвердевшую смесь разбивают и наливают 0,5 л карболовый раствор. Вытяжка должна быть бесцветна и прозрачна. Фильтруют.

Изготовление преципитирующей сыворотки

Асколи и Валенти гипериммунизировали слабым сибиреязвенным антигеном ослов и мулов. В настоящее время гипериммунизируют лошадей.

Определение сибиреязвенных кож

Экстрагируют кожи на холоде в 0,5% карболовом физиологическом растворе. Проба из кож весом 1 г, тщательно измельчаются, заливаются названным раствором и ставятся в холодное место на 2-24 часа. Антиген должен быть совершенно прозрачным. Материал перед исследованием автоклавируют, от этого специфичность реакции страдает, однако работать с обезвреженным материалом безопаснее. Правильным показанием реакции Асколи иногда препятствует предшествующая обработка

кож теми или иными веществами; в частности мокросоленые кожи, кожи, посыпанные известью, нафталином и пр. Это, по-видимому, делает реакцию не специфической.

Техника постановки реакции преципитации (РП)

Приготавливается антиген для реакции преципитации: кусочки кожи мелко нарезаются и вымачиваются в карболовом физиологическом растворе, полученный фильтрат фильтруется через асбестовый фильтр в уленгутовские пробирки. В пробирку наливается сначала активная преципитирующая сыворотка (0,3-0,5 мл), а затем осторожно наливается капиллярной пипеткой экстракт или, наоборот, к первоначально налитому экстракту подсаивают сыворотку, опустив капиллярную пипетку на дно пробирки: поступающая более тяжелая сыворотка, вытесняет экстракт вверх. В положительных случаях кольцо преципитации должно появляться тотчас же или в первые минуты соединения антигена с сывороткой. Для реакции требуются контроли:

-Испытуемого экстракта с физ. раствором.

-Испытуемого экстракта с сывороткой (нормальной).

-Экстрактов нормальной и из органов павшего от сибирской язвы животного с преципитирующей сывороткой.

Тех же экстрактов с нормальной сывороткой

Реакция связывания комплемента (РСК)

Пфейфер, Борде, Эрлих показали, что при инъекциях животному культур микробов, (не образующих токсины) или тканевых клеток (красных кровяных телец, клеток печени, почек) в его сыворотке возникают вещества (бактериолизины, гемолизины, цитолизины), полностью растворяющие микробы или те клетки, которыми иммунизировалось животное. Таким образом, лизины являются строго специфическими антителами. В основание Вассермановской реакции для диагностики сифилиса и положено знаменитое открытие Борде, состоящее в том, что при инъекции морской свинке красных кровяных телец кролика несколько раз в ее сыворотке крови обнаруживаются гемагглютинины и гемолизины, т.е. вещества, склеивающие и растворяющие красные кровяные тельца кролика.

При соединении определенного антигена с антителом происходит связывание комплемента, в случае присутствия его в окружающей среде. Обнаружение антител, связывающих

комплемент производится при помощи феномена гемолизина (это реакция используется в качестве индикатора), происходящего при разрушении эритроцитов соответствующим гемолизином (амбоцептором) при участии комплемента. Если при соединении, какого либо антигена с определенным антителом комплемент свяжется эти комплексы феномен, гемолиза будет отсутствовать (растворение эритроцитов не произойдет); если же при этом фиксация комплемента будет отсутствовать, он окажется свободным и свяжется с гемолизином и произойдет гемолиз (реакция наблюдается в пробирке).

Приготовление компонентов для РСК.

Приготовление физиологического раствора: на 1 л. дистиллированной воды берется 8,5 г химически чистой поваренной соли. Когда соль растворится раствор фильтруют через бумажный фильтр и затем подогревают до кипения.

Приготовление комплемента: морская свинка фиксируется животом вверх. Пальцем нащипывается место, где более ощутимы толчки сердца, это место обрабатывается спиртом. Стерильной иглой прокалывается грудная клетка, игла вводится в сердце, в шприц медленно набирается несколько мл крови (4- 5 мл). Место введения иглы смазывается йодом.

Приготовление эритроцитов барана: у барана выстригается шерстный покров и обрабатывается спиртом место взятия крови. Жгутом сдавливается яремная вена. После наполнения вены в нее вводится стерильная игла. Кровь набирается в стерильный флакон со стеклянными бусами, все время встряхивая. Затем в течение 15 минут флакон с кровью встряхивают для дефибрирования крови. Дефибрированная кровь фильтруется через несколько слоев марли и разливается в центрифужные пробирки, и центрифугируется при 3600 оборотах в течение 15 минут. Затем жидкость отсасывается, наливается физ. раствор и тщательно перемешивается. Центрифугируется 15 минут. Так промывают эритроциты физ. раствором 4 раза, до просветления жидкости. Консервируется эритроциты 2% раствором формалина 1:10.

Кроме того, ставится второй ряд, 10 пробирок, для контроля. В контроль наливаются все компоненты реакции первого ряда в том же количестве, кроме антигена. Вместо антигена наливается по 0,5 мл физиологического раствора.

Титр антигена - наименьшее количество антигена дающего

полный гемолиз 2,5% взвеси эритроцитов барана.

Компоненты для реакции

1. Гемолитическая сыворотка (рабочий титр). Если титр гемолизина-3000, то рабочий титр равен 1500. На 0,02 мл гемолизина, консервированного глицерином добавляют 14,98 мл физ. раствора получается разведение 1:1500 (рабочий титр гемолизина).

2. Комплемент - свежая сыворотка морской свинки 1:10 т.е. 1 мл комплемента + 9 мл физ. раствора.

3. Эритроциты барана 2,5% взвесь на физ. растворе.

4. Физиологический раствор.

Схема титрования гемолизина

Гемолизин (гемолитическая сыворотка) в ампулах, консервированный глицерином. Для титрования гемолизина готовится основное разведение гемолизина на физ. растворе 1:100. т.к. в стандартном гемолизине содержится 1 часть гемолизина и 1 часть консерванта, то при разведении берется гемолизин в количестве 0,2 мл + 9,8 мл физ. раствора (разведение 1:100). В штатив ставится 2 ряда пробирок: 1 ряд для разведения, 2 ряд для реакции.

1 ряд

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Разведение								
1:10	1:150	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	1:350	1:400
0	0	0	0	0	0	0	0	0
Гемолизин								
	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор								
	0,4	0,9	1,4	1,9	2,4	2,0	3,4	3,9

Наименьшее количество гемолизина дающего полный гемолизин 2,5% взвеси эритроцитов барана на физ. растворе.

Рабочий титр - титр вдвое увеличенный; готовится следующим образом: если титр гемолизина 3000 то рабочий титр будет 1500. На 0,2 мл гемолизина + 14,98 мл физиологического раствора.

2 ряд									
Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2,5 % эритроциты барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В водяную баню на 15 минут при $T - 37^{\circ}\text{C}$									

Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты реакции	Пробирки											
1:10 комплемент	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
Физиологический раствор	0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Гемолизин рабочий титр	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2,5% эритроциты барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
В водяную баню на 15 минут при $T - 37^{\circ}\text{C}$												

Схема титрования комплемента в бактериологической системе

Компоненты реакции	Пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
56-57 $^{\circ}\text{C}$ без активная	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1:10 комплемент	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор	0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
Антиген	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
На водяной бане при $T - 37^{\circ}\text{C}$ выдерживать 20 минут										
Гемолизин по рабочему титру	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

2,5% эритроциты барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
На водяной бане при $T - 37^{\circ}\text{C}$ выдерживать 20 минут										

Схема постановки главного опыта РСК

Компоненты Реакции	Положительная сыворотка			Отрицательная сыворотка		
	1:5	1:10	1:10	1:5	1:10	1:10
$T - 56^{\circ}\text{C}$ сыворотка отрицательной активностью	0,1	0,05	0,05	1,0	0,05	0,05
Титрованный антиген	0,5	0,5	-	0,5	0,5	-
Физиологический раствор	0,4	0,45	0,95	0,4	0,45	0,95
Титрованный компонент	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$T - 37^{\circ}\text{C}$ в водяной бане 20 минут						
Гемолизин по рабочему титру	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2,5% эритроциты барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$T - 37^{\circ}\text{C}$ в водяной бане 20 минут						
Результат	Гемолиз приотанвлен	Гемол из приотановлен	Гемол из	Гемол из	Гемол из	Гемол из

При положительной реакции отмечают задержку гемолиза.

Интенсивность реакции оценивают в знаках плюс (+):

++++	Полная задержка гемолиза (жидкость бесцветная и осадок эритроцитов)
+++	Ясная задержка гемолиза (жидкость слабо розовая и значительный осадок эритроцитов)
++	Частичная задержка гемолиза
+	Слабая задержка гемолиза
-	Отсутствие гемолиза

Заведомо положительные и отрицательные сыворотки в разведении их 1:5 инактивируются при температуре 56-57° в водяной бане.

Титр комплемента - наименьшее количество комплемента дающего полный гемолиз 2,5% эритроцитов барана в физиологическом растворе.

Вопросы:

1. Что такое «серологические реакции» и их значение в микробиологических исследованиях?
2. Дайте характеристику понятиям «антигены», «антитела», «иммунные комплексы».
3. Иммунологические реакции и их значение в защите организма животных и птиц.
4. Назовите виды серологических реакций?
5. Перечислите компоненты для постановки РА. Как ведется учет результатов РА.
6. Охарактеризуйте РП. В каких случаях в практике широко применяется данная реакция?
7. Какие виды РП вы знаете?
8. Опишите механизм постановки реакции связывания комплемента (РСК).
9. Что из себя представляет комплемент и какую роль играет комплемент в данной иммунологической реакции?
10. Сколько комплексов принимают участие в РСК?
11. Что такое титрация компонентов реакции? Что такое диагностический титр?

Литература:

1. Бияшев К.Б. Ветеринарная микробиология и иммунология. Учебник /Бияшев К.Б.-2-е изд.- Алматы: Нур-Принт, 2015.-417с.
2. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и микология. Учебник /Колычев Н.М., Госманов Р.Г.-СПб.: Лань, 2014.-624с.
3. Тлепов А.А. Микробиология. Уч.пособие для вузов. Эверо,2015.-312с.
4. Зверев В. В, Бойченко М. Н. и др. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1: учебник по дисциплине «Микробиология, вирусология и иммунология» для студентов учреждений высш. проф. образования. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 448 с. : ил. + CD.
5. Рудаков Н.В. Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. В 2 частях: Учебное пособие. - Омск, 2002.- 96с.
6. Литусов Н.В. Возбудители бруцеллеза. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012. - 38 с.
7. Литусов Н.В. Физиология бактерий. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2015. – 43 с.
8. Литусов Н.В. Род *Rickettsia*. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2017. – 35 с.
9. Литусов Н.В. Частная бактериология. Электронное иллюстрированное учебное издание. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 707 с.
10. Медуницын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней: Учеб. пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.: ил.
11. Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин и др.; Инфекционные болезни животных / Под ред. А. А. Сидорчука. — М.: КолосС, 2007. — 671 с, [18] л. ил.: — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
12. Канашкова Т. А. и др. Специфическая иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний : учеб.-метод. пособие– Минск : БГМУ, 2009. – 84 с.
13. Красочко П. А., Максимович В. В., Синица Н. В., Яромчик Я. П., Притыченко А. В., Гайсе С. Л., Билецкий О. Р. Туберкулез : учеб. - метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины - Витебск : ВГАВМ, 2020. - 60 с.

14. Н.Г. Захарова, В.И. Вершинина, О.Н. Ильинская Краткий курс по микробиологии, вирусологии и иммунологии – Казань: 2015.-799с.

15. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н Бруцеллёз. Современное состояние проблемы – Ставрополь: ООО «Губерния», 2019. – 336 с.

16. Макаров В.В., Грубый В.А., Груздев К.Н., Сухарев О.И.. Список МЭБ и трансграничные инфекции животных: монография - Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2012. - 162 с.: ил.

17. Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Фено- и генотипический профиль стафилококков как возбудителей эндогенных инфекций. Электронный журнал On-line версия журнала. <http://www.elmag.uran.ru>. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2019, №3 С.-2-12.

18. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. С.-1:101-108.

19. Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П., Мавзютов А.Р., Гриценко В.А. *Staphylococcus aureus*: генетическое разнообразие с учетом источника выделения. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. 3. 10с. [Электр. ресурс] (URL: [http:// elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/KOL-2018-3.pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/KOL-2018-3.pdf)). DOI: 10.24411/2304-9081-2018-13014

20. Литусов Н.В. Грамположительные аэробные кокки. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2016. – 89 с.

21. Донецкая Э.Г., Зрячкин Н.И. Анаэробы и их роль в инфекционной патологии. Саратов. 2020. -126с.

22. Листерия Источник: <https://meduniver.com/Medical/Microbiology/394.html> MedUniver

23. Злокачественный отек у диких животных [электронный ресурс]// Злокачественный отек – http://www.zooclub.ru/veter/oedema_malignum.shtml - 01.12.14;

24. Г.Д. Чужебаева Диагностика пастереллеза крупного рогатого скота методом ПЦР. Монография. - Костанай, 2017.- 106 с.

25. Руководство к практическим занятиям по дифференциальной диагностике возбудителей чумы, энтеропатогенных иерсениозов (псевдотуберкулеза и кишечного

иерсениоза) и пастереллёза: учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 40 с.

26. Хиштова Н.С. Лекции по частной микробиологии / Н.С. Хиштова.- Майкоп: ИП Магарин О.Г., 2012.- 126 с.

27. Ермагамбетова С.Е., Бияшев К.Б., Бияшев Б.К., Киркимбаева Ж.С. Ветеринарная микробиология и вирусология. Учебное пособие. Алматы: TechSmith, 2021.-308с.

**Х.Б. Юнусов, Д.Д. Алиев,
Ж.С. Киркимбаева**

«ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ»

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

**для студентов, обучающихся по направлению подготовки
«Ветеринария»**

**Издательско-полиграфический центр
Самаркандского государственного университета ветеринарной
медицины, животноводства и биотехнологий**

Права на издательско-полиграфический деятельность на основании
подтверждений Агентства информации и массовых коммуникаций при
Администрации Президента Республики Узбекистан
от 10.05.2024 г. № 273109 и от 24.05.2024 г. № 283607



**Директор
Редактор
Тех. редактор**

**Ж.Шукуров
Л.Хошимов
А.Умаров**

ISBN: 978-9910-8603-3-1

9893



Подписано в печать 27.12.2024 г. Формат 60x84_{1/16}.

Печать офсетная. Гарнитура Times New Roman.

Ус. п. л.: 18.5. Изд. п. л.: 18.0

Тираж 30 экз. Заказ № 18/11.

**Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре
Самаркандского государственного университета
ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологий
г. Самарканд, ул. Мирзо Улугбека, 77**

ISBN 978-9910-8603-3-1



9 789910 860331