Министерство образования и науки Республики Казахстан

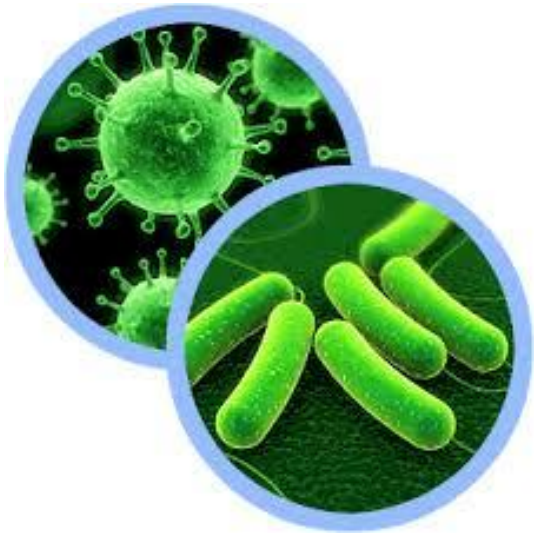
Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова

Кафедра ветеринарной санитарии

Елеусизова А.Т.

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ (Часть 1)

учебное пособие



Костанай, 2018

УДК 619
ББК 48.4
Е 50

Елеусизова Анара Тулегеновна, доктор философии (PhD), ст. преподаватель

Рецензенты:
Кауменов Нурлан Сарсенбаевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой ветеринарной санитарии
Алиханов Куантар Дауленович, доктор философии (PhD), заведующий кафедрой ветеринарной санитарии Казахского национального аграрного университета
Мурзакаева Гульмира Калихановна, доктор философии (PhD), старший преподаватель кафедры ветеринарной санитарии Казахского агро-технологического университета имени С.Сейфуллина

Елеусизова А.Т.
Е 50 Микробиология и вирусология (часть 1). Учебное пособие для выполнения лабораторных работ - Костанай: КГУ имени А. Байтурсынова, 2018 г. – 141 с.

В учебном пособии изложены структурная организация бактериальной клетки, морфология, способы культивирования бактерий на исскуственных питательных средах, особенности вирусов, их организация, методы индикации и идентификации. Описаны современные методы лабораторной диагностики болезней вирусной и бактериальной этиологии.

Пособие содержит: наименование раздела и темы, цель занятия, оборудование, вопросы для самоконтроля и задания.

Данное учебное пособие предназначено для выполнения лабораторных занятий студентами ветеринарных и биологических специальностей.

ISBN 978-601-7933-79-1

Утверждено на заседании Учебно-методического совета Костанайского государственного университета имени А.Байтурсынова, протокол от ______ _____ 20___г. № ____.

© Костанайский государственный
университет им. А.Байтурсынова, 2018

Содержание

Введение..... 5

Раздел I. Общая микробиология..... 6

1.1 Ветеринарная лаборатория, структура и оборудование..... 6

1.2 Общая схема бактериологической диагностики..... 10

A. Микроскопический метод исследования

1.3 Устройство оптического микроскопа и правила работы с ним..... 11

1.4 Краткая систематика микроорганизмов, основные понятия..... 17

1.5 Особенности строения бактериальной клетки..... 20

1.6 Морфология бактерий..... 25

1.7 Химический состав бактериальной клетки..... 28

1.8 Анилиновые красители, их применение в лабораторной практике. Приготовление бактериологического препарата..... 33

1.9 Способы окраски бактерий Метод по Граму. Метод Циль-Нильсена. Окраска спор и капсул..... 37

1.10 Вопросы для самоконтроля и проверки знаний..... 44

B. Бактериологический метод исследования

1.11 Питательные среды, классификация и применение в бактериологии. Техника посевов микроорганизмов..... 47

1.12 Методы культивирования микроорганизмов (аэробных и анаэробных) Техника посева бактерий в жидкие и плотные питательные среды..... 52

1.13 Методы выделения чистой культуры бактерий..... 59

1.14 Культуральные свойства микроорганизмов..... 65

1.15 Ферментативные свойства микроорганизмов..... 69

1.16 Методы определения подвижности бактерий..... 78

1.17 Методы стерилизации..... 80

1.18 Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам..... 90

C. Биологический метод исследования

1.19 Лабораторные животные. Методы заражения животных..... 95

1.20 Методы определения патогенности микроорганизмов..... 99

Раздел II. Общая вирусология..... 103

2.1 Правила работы в вирусологической лаборатории..... 103

2.2 Морфология и химический состав вирусов..... 105

2.3 Подготовка вируссодержащего материала для исследования..... 111

2.4 Морфологические методы индикации вирусов в патологическом материале..... 113

2.5 Электронно-микроскопическое исследование вирусов..... 115

2.6 Лабораторные животные, и применение их в вирусологии..... 116

2.7 Куриные эмбрионы и их применение в вирусологии..... 123

2.8 Вскрытие куриного эмбриона, индикация вируса и получение вируссодержащего материала..... 128

2.9 Культуры клеток и их использование в вирусологии..... 131
2.10 Индикация вирусов в культуре клеток по цитопатогенному действию. 135
2.11 Бактериофаги. Идентификация фага в культуре бактерий..... 137
Список использованной литературы..... 141

Введение

При подготовке биологических, ветеринарных специалистов дисциплине «Микробиология и вирусология» отводится одно из ведущих мест. Знания, полученные при изучении этой дисциплины, составляют основу для проведения лабораторной диагностики инфекционных болезней, микробиологической оценки санитарного состояния объектов окружающей среды, а также обеспечения безопасности пищевых продуктов и кормов.

Предлагаемое учебное пособие по микробиологии и вирусологии содержит современную информацию по программе преподавания микробиологии и вирусологии на ветеринарных, аграрно-биологических факультетах. Пособие включает два раздела: «Общая микробиология» и «Общая вирусология».

Значительно расширена и дополнена информация по современным методам диагностики, к которым отнесены реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция.

Для достижения большей эффективности самоподготовки и контроля знаний большинство разделов завершают контрольные вопросы, тестовые задания, которые могут быть использованы для компьютерного контроля. Пособие рассчитано для лабораторно-практических занятий на базе теоретических знаний.

При составлении пособия автор стремился максимально использовать существующую нормативно-техническую документацию по диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Все практические замечания и пожелания автором будут приняты с признательностью и благодарностью.

Раздел I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Главной целью изучения *общей микробиологии* является получение знаний и приобретение навыков самостоятельной практической работы, необходимых для проведения микробиологических исследований любой направленности, лабораторной диагностики инфекционных болезней, бактериологического исследования пищевых продуктов, кормов и другого материала.

Правильно и своевременно поставленный диагноз определяет основные условия организации и проведения мероприятий по ликвидации инфекционных болезней, характер и эффективность мер по искоренению очагов инфекции, успех специфической профилактики и терапии.

При диагностике инфекционных болезней используют комплекс методов:
- эпизоотологические, клинические, патологоанатомические и лабораторные данные.

В большинстве случаев для окончательного подтверждения диагноза проводят **лабораторную диагностику**, которая включает:
- бактериологическую, вирусологическую, микологическую, в зависимости от вида возбудителя (бактерии, вирусы, микроскопические грибы);
- серологическую диагностику;
- аллергологическую диагностику;
- молекулярно-генетическую диагностику.

I. Бактериологическая диагностика состоит из трех этапов (Приложение А):
1. Микроскопия окрашенных препаратов;
2. Посев на питательные среды с выделением чистой культуры бактерий для установления культуральных и ферментативных свойств возбудителя;
3. Биопроба (заражение лабораторных животных) для определения вируленности, выделенных бактерий.

II. Серологическая диагностика включает в себя постановку серологических реакций, с целью выявления специфических АТ в сыворотке больного.

III. Аллергологическая диагностика основана на использовании аллергенов.

IV. Молекулярно-генетическая диагностика основана на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), метода ДНК-гибридизации и др.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

1.1 Ветеринарная лаборатория, структура и оборудование

Цель занятия. Ознакомить студентов с организацией и оборудованием ветеринарных лабораторий, с техникой безопасности при работе. Усвоить общую схему проведения бактериологической диагностики. Освоить технику взятия и консервации патологического материала.

Материальное оснащение. Оборудование, аппаратура. Органы от трупов животных. Пинцеты, скальпели, ножницы. Деревянный ящик с опилками, металлический ящик, банки, полиэтиленовые мешочки и пленка, 5%-ный

раствор карболовой кислоты, 30% раствор глицерина, хлористый натрий, дистиллированная вода.

Принципы организации и оборудование ветеринарных лабораторий

Ветеринарные лаборатории - это учреждения государственной службы, деятеятельность которых направлена на обеспечение благополучия в животноводстве, предупреждение и ликвидацию болезней и падежа животных, а также на охрану населения от болезней, общих для животных и человека.

Лабораторная диагностика проводится ветеринарными лабораториями, которые по масштабу своей деятельности подразделяются на республиканские, областные, районные, специальные – на предприятиях, перерабатывающих животноводческую продукцию (мясо-, молочные, и др.).

Основная задача ветеринарных лабораторий - установление точного диагноза инфекционных болезней (туберкулез, бруцеллез, сибирскую язву, рожу свиней и др.) сельскохозяйственных животных (включая птиц), пушных зверей, рыб и пчел, а также проведение ветеринарно-санитарной экспертизы мяса, молока и других пищевых продуктов и кормов.

Материал в лаборатории исследуют бактериологическими, серологическими, гистологическими методами, для чего должны быть созданы необходимые условия (специально отведенные помещения, оборудование, микроклимат и др.).

Ветеринарные лаборатории размещают в отдельном здании, вдали от проезжих дорог, крупных городов, ограждены забором и насаждениями.

В лаборатории предусматривают: административное крыло, приемное отделение (в настоящее время – это отдел приема проб и информации), патологоанатомический (вскрывочная), серологический, бактериологический, вирусологический и паразитологический отделы; ПЦР-боксы; в отдельном крыле располагается отдел пищевой безопасности (радиологический, отдел микробиологии, химико-токсикологическая лаборатория); также выделяют специальные помещения для термостатов, для стерилизационного оборудования.

Бактериологические лаборатории обычно размещаются в нескольких помещениях.

В каждой лаборатории предусмотрены: а) боксы для работы с отдельными группами бактерий или вирусов; б) помещения для серологических исследований; в) приготовления питательных сред; г) стерилизации, мойки посуды; д) виварий с боксами для здоровых и подопытных животных.

В комнате для мытья посуды должны быть столы, раковины, горячая и холодная вода, газовая плита или электрическая плитка, стеллажи для мытой посуды, вытяжной шкаф, эмалированные ванны, тазы и другие емкости, раствор в стеклянных сосудах для обеззараживания пипеток, предметных стекол и другой посуды.

В лаборатории предусмотрено следующее *оборудование:* биологический иммерсионный микроскоп с дополнительными приспособлениями (осветителем, фазово-контрастным устройством, темнопольным конденсором и др.), люминесцентный микроскоп, термостаты, оборудование для стерилизации

(автоклавы, сушильные шкафы), pH-метр, аппарат для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифуги, технические, аналитические и торзионные весы; аппаратура для фильтрования (фильтры Зейтца и бактериальные свечи), водяные бани, холодильники, аппарат для изготовления ватно-марлевых пробок;

набор инструментов – бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др.,

лабораторная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри, матрасы, флаконы, ампулы, пастеровские пипетки, градуированные на 1, 2, 3, 4, 5 и 10 мл) и другое оборудование.

В лаборатории необходимо иметь место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы красителей, спирт для обесцвечивания, фильтровальная бумага и др. Каждое рабочее место должно быть снабжено газовой горелкой (или спиртовкой) и банкой с дезинфицирующим раствором.

Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами. Химическими реактивами, диагностическими сыворотками и другими материалами.

Техника безопасности при работе в лаборатории

Заходить и работать в лаборатории только в специальной одежде - халате и белой шапочке (халат должен быть наглухо застегнут, волосы подобраны под шапочку).

В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания. За каждым студентом под определенным номером закрепляется рабочее место, микроскоп и другое оборудование.

На рабочем месте можно размещать только необходимое оборудование для выполнения работы. Обычно это набор красок, бутыль с водой, сливная чашка, чашка с чистыми предметными стеклами, бактериологическая петля, банка с дезинфицирующим раствором.

Без разрешения преподавателя или обслуживающего персонала нельзя включать электроприборы и другую аппаратуру.

Каждый студент должен строго соблюдать аккуратность в работе, содержать в чистоте рабочее место и оборудование.

При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность – банки с материалом снаружи обтирать дезинфицирующим раствором и ставить только на подносы.

Если в процессе работы инфицированный материал случайно попал на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюктиву, в рот – нужно немедленно обратиться к преподавателю.

По окончании работы патологический материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты поместить в биксы для обеззараживания.

Перед уходом из лаборатории необходимо снять специальную одежду, тщательно обработать руки дезинфицирующим раствором и вымыть с мылом.

Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала

При отборе и обработке патологического материала для пересылки в лабораторию необходимо придерживаться следующих правил:

- учитывать патогенез болезни и тропизм возбудителя;
- использовать стерильные инструменты и посуду;
- доставлять его в максимально сжатые сроки;
- отбирать материал до начала лечения антимикробными препаратами.

В лабораторию могут быть направлены: а) пробы материала от больных и подозрительных в заболевании животных: кровь, сыворотка крови, кал, моча, молоко, экссудаты, гной, соскобы с кожи и др.; б) патологический материал от трупов животных: абортированный плод, трубчатая кость, лимфоузлы, мышцы, головной мозг, спинной мозг, паренхиматозные органы и др.; в) пробы из объектов внешней среды: воды, почвы, фуража; насекомые, грызуны и др.

Трупы мелких животных, а также поросят, ягнят, телят лучше посылать целиком во влагонепроницаемой таре.

Трубчатые кости, посылаемые на исследование, должны быть целыми, с неповрежденными концами, обернутыми в марлю или полотно, смоченное дезинфицирующей жидкостью (5%-ным раствором карболовой кислоты).

Перед отбором молока сосок вымени дезинфицируют 70°-ным спиртом, сдаивают 100 – 150 мл молока в банку с дезраствором, а последующие порции в количестве 30 мл – в стерильные сосуды.

Кровь берут в пробирки или колбы из яремной вены с соблюдением стерильности. Кал берут из прямой кишки стеклянной трубочкой с оплавленными краями, один конец трубочки закрывают ватно-марлевой пробкой. После взятия кала трубку опускают в пробирку с физиологическим раствором. Мочу у животных берут с помощью катетера.

Экссудат берут пастеровскими пипетками или стерильными тампонами.

Соскобы со слизистых оболочек и кожи берут стерильным скальпелем в стерильную посуду с пробкой.

Абортированный плод первой половины беременности направляют целиком. От плодов второй половины беременности берут паренхиматозные органы или плод направляют целиком.

От трупов обязательно берут сердце целиком с кровью.

Кусочки селезенки, почек, печени с желчным пузырем берут, используя стерильные инструменты и стерильную посуду. Желудок и кишечник перевязывают лигатурой с обоих концов и помещают в отдельную посуду. Мозг для исследования направляют целиком.

При упаковке патологического материала необходимо исключить загрязнение его посторонней микрофлорой из внешней среды. Патологический материал должен быть доставлен в лабораторию в течение первых 24 часов после его взятия. Если эти условия трудно выполнить, то материал необходимо консервировать 30%-ным водным раствором глицерина или 10%-ным водным раствором хлористого натрия или раствором глицерина с хлористым натрием (глицерина – 250,0 мл; хлористого натрия – 5,0 г; дистиллированной воды –

750,0 мл). Доставка патологического материала в лабораторию осуществляется нарочным. На взятый патологический материал, направляемый в лабораторию, составляется сопроводительное письмо.

Контрольные вопросы:
1. Цель изучения общей микробиологии.
2. Методы лабораторной диагностики инфекционных болезней.
3. Ветеринарные лаборатории – структура и задачи.
4. Оборудование в бактериологической лаборатории.
5.Техника безопасности при работе в лаборатории.
6. Правила взятия патологического материала для исследования.

1.2 Общая схема проведения бактериологической диагностики

Цель занятия. Ознакомить студентов с особенностями проведения микробиологических исследований биоматериала. Усвоить общую схему проведения диагностики инфекционных болезней.

С целью изучения отдельных видов бактерий необходимо овладеть техникой выделения, типирования и идентифицирования микроорганизмов в условиях лаборатории.

Бактериологическая диагностика начинается со взятия, консервирования и транспортировки биоматериала, и включает три этапа исследования:

A. ***Микроскопические исследования*** исходного материала позволяют обнаружить наличие в нем возбудителя, изучить его морфологические особенности и тинкториальные свойства.

B. ***Бактериологические исследования*** проводятся с целью выделения чистой культуры возбудителя с установлением его морфологических, тинкториальных, культурально-биохимических свойств, а в ряде случаев – антигенной структуры.

C. ***Биологические исследования (постановка биопробы)*** проводятся путем заражения лабораторных животных, которые позволяют определить вирулентность возбудителя, а также выделить его в чистой культуре.

D. Проведенные исследования позволяют ***определить видовую принадлежность возбудителя*** и поставить бактериологический диагноз.

A. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроскопическое исследование (микроскопия) представляет собой наиболее простой и информативный метод лабораторной диагностики. Он заключается в исследовании материала под микроскопом: оптическим, электронным, люминесцентным и т.д.

Этот метод позволяет обнаружить микроорганизмы в препаратах, изучить их ***морфологические особенности, подвижность*** и ***тинкториальные свойства.***

Для освоения микроскопического метода необходимо **знать:**
- устройство микросокопа и виды микроскопов;
- ультраструктуру бактериальной клетки и морфологические особенности;
- химический состав микробной клетки;
- приготовление препаратов для микроскопии и способы их окрашивания;
- методы определения подвижности бактерий.

Контрольные вопросы:
1. Основная схема бактериологической диагностики.
2. Сущность микроскопического метода иследования.
3. Виды микроскопии.

1.3 Устройство оптического микроскопа и правила работы с ним

Цель занятия. Изучить устройство оптического микроскопа и освоить правила работы с ним. Дать представление о видах и назначении различных методов микроскопии.

Материальное оснащение. Микроскопы оптические и набор готовых окрашенных препаратов-мазков. Иммерсионное масло, осветители.

Микроорганизмы представляют собой мельчайшие живые организмы, невидимые невооруженным глазом. Размеры их колеблются в широких

пределах – от 0,2 до 10 микрометров (мкм) и более (1 мкм составляет 1/1000 долю миллиметра).

Бактериальныхе клетки изучают при помощи микроскопии, чаще всего в убитом окрашенном состоянии, реже – в живом неокрашенном виде.

Для изучения окрашенных бактериальных препаратов используют световой микроскоп.

Микроскопы позволяют исследовать объекты в проходящем свете. Такие микроскопы состоят из механической и оптической частей (рис.1).

Устройство оптического микроскопа

Рисунок 1 – Строение световового иммерсионного микроскопа

Механическая часть светового микроскопа включает штатив *(1)* с предметным столиком *(2)* и тубус *(16)*. Предметный столик с помощью винтов может перемещаться в горизонтальной плоскости *(3)*. Он имеет две клеммы, фиксирующие препарат*(4)*. Верхняя часть штатива – тубусодержатель – может перемещаться с помощью макрометрического винта *(12)* и микрометрического винта *(13)*, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки препарата. Микрометрический винт является одной из наиболее хрупких частей микроскопа и обращаться с ним нужно особенно осторожно. Полный поворот его передвигает тубус на 0,1 мм.

В верхней части тубусодержателя находится вращающийся вокруг своей оси револьвер *(14)*, в отверстия которого ввинчены объективы *(15)*. В верхний конец тубуса вставляется окуляр *(18)*.

Оптическая часть состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе. На окуляре имеются цифровые обозначения, показывающие степень увеличения изображения в 7, 10, 18 раз.

Объектив представляет собой систему оптических линз. На объективах имеются обозначения, указывающие увеличение, даваемое объективом (х10, х40, х100). Различают сухие и иммерсионные объективы. Объективы, дающие увеличение в 4 и 40 раз, называются сухими, так как при работе между объективом и препаратом находится слой воздуха. Иммерсионным называется объектив, при работе с которым между препаратом и объективом помещается капля иммерсионного (кедрового) масла. Иммерсионное масло имеет оптический коэффициент преломления, близкий к коэффициенту преломления стекла, благодаря этому световые лучи, не отклоняясь от своего первоначального направления, попадают на линзу объектива.

Общее увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением величины увеличения объектива на величину увеличения окуляра. Отчетливость получаемого изображения зависит от разрешающей способности микроскопа – минимального расстояния между двумя точками, воспринимаемыми раздельно. Световой микроскоп при освещении видимым светом имеет разрешающую способность около 0,2 мкм.

Осветительный аппарат состоит из конденсора, зеркала, ирисовой диафрагмы. Он предназначен для наилучшего освещения препарата. Лучи света, исходящие от источника света, направляются в конденсор, концентрирующий свет в своем фокусе. Конденсор с ирисовой диафрагмой представляет собой систему оптических линз и служит для собирания лучей света и направления их с помощью винта. При опускании конденсора поле зрения несколько затемняется, при поднятии – освещается. Ирисовая диафрагма служит для регулирования интенсивности света, которое осуществляется с помощью рычага расширением или сужением отверстия, пропускающего свет к конденсору.

Выпускаются также дополнительные приспособления к микроскопу, которые позволяют максимально использовать все его возможности, облегчают условия работы и значительно расширяют диапазон применения.

В микробиологии часто используются следующие приспособления:

1. Конденсор темного поля.
2. Фазово-контрастное приспособление КФ-1, КФ-4 и другие модели.
3. Бинокулярная насадка, приближающая микроскопию к условиям естественного зрения.
4. Окуляр-микрометр и объект-микрометр, предназначенные для измерения микроскопических объектов.
5. Нагревательный столик, который устанавливается вместо предметного столика микроскопа для обеспечения постоянной температуры 37°С. Применяется для длительного наблюдения за живыми микроорганизмами.
6. Микрофотонасадки для фотографирования микроскопических объектов.

7. Микроустановка для цейтраферной (прерывистой) микрокиносъемки, применяющаяся в сочетании с фазово-контрастной микроскопией, позволяет изучить динамику развития и размножения микроорганизмов, влияние на них разных факторов и многие другие вопросы.

Правила работы со световым микроскопом:

1. Установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа, для чего:

- поставить объектив х8 на 1-1,5 см выше от уровня предметного столика микроскопа,
- поднять конденсор до уровня предметного столика (диафрагму открыть),

2. Установить препарат, укрепив клеммами.
3. Нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата.
4. Заменить объектив х8 на х100.
5. Погрузить объектив х100 в масло с помощью макровинта.
6. Наблюдая в окуляр, установить макровинтом какое-либо изображение.
7. С помощью микровинта, вращая его на пол-оборота в ту или иную сторону, установить четкое изображение.

После окончания работы привести микроскоп в порядок для хранения:

1. Поднять макровинтом тубус микроскопа.
2. Убрать препарат.
3. Салфеткой снять с объектива х100 масло и установить объектив х4.
4. Опустить конденсор.
5. Подложить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

Виды микроскопии и их назначение

Для микробиологических исследований используют различные виды микроскопии: световую, люминесцентную, темнопольную, фазово-контрастную, электронную.

Наиболее распространенным методом является световая (оптическая) микроскопия. При микроскопировании изучают морфологию микроорганизмов, их тинкториальные свойства (отношение к красителям), а также структурные особенности (споры, капсулы), подвижность и др.

Микроскопия с фазово-контрастным устройством. С помощью фазово-контрастного устройства различия в фазе световых лучей при прохождении их через прозрачные объекты превращаются в амплитудные, в результате чего объекты становятся контрастными. Метод фазового контраста позволяет увидеть прозрачные объекты более четко (контрастно), но не увеличивает разрешающей способности микроскопа. Основная ценность этого метода состоит в том, что он дает возможность наблюдать живые объекты без их фиксации и окрашивания.

Фазово-контрастное устройство представляет собой приставку к микроскопу и состоит из специальных фазовых объективов, дающих различное увеличение, конденсора с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует определенному объективу, и вспомогательного микроскопа. Все фазовые объективы имеют на оправе букву «Ф».

Микроскопия в темном поле. Микроскопия в темном поле основана на освещении объекта косыми лучами света (рис. 4). Лучи не попадают в объектив

и остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит совершенно черным. Если препарат содержит микроорганизмы, то косые лучи в определенной степени отражаются от их поверхности и, отклоняясь от своего первоначального направления, попадают в объектив. В этом случае на интенсивно черном поле видны ослепительно яркие светящиеся объекты. Такое освещение достигается применением специального темнопольного конденсора, имеющего затемненную среднюю часть. Поэтому центральные лучи света, идущие от зеркала, задерживаются, а в плоскость препарата попадают только боковые лучи, отраженные от зеркальных поверхностей, расположенных внутри конденсора.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты за пределами видимости обычного микроскопа. Однако наблюдение объектов в темном поле позволяет различить только их контуры и не дает возможности рассмотреть внутреннее строение.

Люминесцентная микроскопия. Люминесцентный микроскоп состоит из сильного источника ультрафиолетового света, светофильтров и биологического микроскопа. Между источником света и зеркалом микроскопа устанавливается сине-фиолетовый фильтр. Лучи света с короткой волной, попадая на препарат, возбуждают в нем свечение. На окуляр микроскопа ставят желтый фильтр, который отсекает сине-фиолетовые лучи и пропускает длинноволновые лучи, видимые глазом. В люминесцентной микроскопии большое значение имеет иммунофлюоресцентный метод с использованием специфических люминесцентных сывороток.

Их приготовление основано на способности некоторых флюорохромов, например изоцианат флюоресцеина, вступать в химическую связь с сывороточными белками без нарушения их иммунологической специфичности.

При прямом иммунофлюоресцентном методе специфические антитела, связавшиеся с микробными антигенами, образуют комплексы, которые светятся при люминесцентной микроскопии препаратов. При непрямом методе вначале антиген обрабатывают гомологичными нефлюоресцирующими антителами, образуется комплекс антиген - антитело, для обнаружения которого применяют флюоресцирующую антивидовую сыворотку, соответствующую виду животного продуцента гомологичных антител. Антивидовые сыворотки получают, иммунизируя животных глобулинами животных тех видов, которые служат продуцентами антимикробных антител.

Электронная микроскопия. Электронная микроскопия делает возможным наблюдение объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных элементов микроорганизмов, макромолекулярных структур и др. субмикроскопических объектов.

В электронных микроскопах световые лучи заменяет поток электронов, имеющий при определенных ускорениях длину волны около 0,005 нм, т.е. почти в 100 000 раз короче длины волны видимого света. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически

составляющая 0,1-0,2 нм, позволяет получить общее полезное увеличение до 1 000 000 раз (рис. 2).

Наряду с приборами «просвечивающего» типа, используют «сканирующие» электронные микроскопы, обеспечивающие рельефное изображение поверхности объекта. Разрешающая способность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего» типа.

Рисунок 2 – Электронный микроскоп

Задания для самостоятельной работы

1. Изучить устройство оптического микроскопа.
2. Освоить правила работы со световым микроскопом.
3. Провести просмотр готовых окрашенных препаратов-мазков.

Вопросы для самоподготовки и контроля знаний:

1. Иммерсионный масляный объектив от других объективов отличается:
   А. Черной полосой.
   Б. Белой полосой.
   В. Цифрой х100.
   Г. Цифрой х40.
2. При микроскопии препарата с использованием объектива х100 и окуляра х10 выявлена слабая освещенность поля зрения. Ваши действия по устранению этого недостатка:
   А. Поднять конденсор до уровня предметного столика.
   Б. Проверить и открыть диафрагму конденсора.
   В. Нанести на препарат иммерсионное масло.
3. Завершив микроскопию с использованием иммерсионной системы, необходимо сделать:

А. Поднять макровинтом тубус из масла и убрать препарат.

Б. Убрать препарат, поднять тубус микроскопа макровинтом.

В. Макровинтом поднять тубус, убрать препарат, салфеткой снять с объектива масло, поставить объектив х8, подложить салфетку под объектив, опустить тубус и конденсор.

4. Установлено, что стафилококки при микроскопировании имеют диаметр, равный 1,35 мм, в действительности этот микроорганизм имеет диаметр, равный 1 мкм. Определите, при каком сочетании объектива и окуляра проводилась микроскопия?

А. Объектив х40, окуляр х15.

Б. Объектив х90, окуляр х7.

В. Объектив х90, окуляр х10.

Г. Объектив х90, окуляр х15.

5. Конденсор микроскопа предназначен для:

А. Уменьшения светового потока.

Б. Фокусирования световых лучей на плоскости рассматриваемого объекта.

В. Увеличения изображения объекта.

6. Микровинт микроскопа предназначен для:

А. Фокусировки при работе с объективом х40.

Б. Фокусировки при работе с объективом х90.

В. Перемещения препарата при микроскопии при работе с объективом х90.

1.4 Краткая систематика микроорганизмов, основные понятия

Цель занятия. Ознакомить студентов с краткой современной классификацией микроорганизмов.

Микроорганизмы представлены

доклеточные формы:	**и**	**клеточными формами:**
вирусы — царство *Vira*		бактерии, архебактерии, грибы и простейшие.

Основные группы микроорганизмов это:

1. Бактерии
2. Плесневые грибы
3. Простейшие
4. Вирусы.

Согласно современной классификации, на основании филогенетического анализа 16s-рРНК, все живые организмы поделены на **3 домена** (надцарства): «Bacteria», «Archaea» и «Eukarya»:

□ *домен «Bacteria»* — прокариоты, представленные настоящими бактериями (эубактериями);

□ *домен «Archaea»* — прокариоты, представленные архебактериями;
□ *домен «Eukarya»* — эукариоты, клетки которых имеют ядро с ядерной оболочкой и ядрышком, а цитоплазма состоит из высокоорганизованных органелл — митохондрий, аппарата Гольджи и др.

Домен ***«Eukarya»*** включает:
- царство грибов *Fungi*;
- царство животных *Animalia* (включает прстейшие – *подцарство Protozoa*);
- царство растений *Plante.*

Согласно руководству «Определитель бактерий» Д.Берджи (2001г.) все бактерии включены в 2 домена:
1. «Bacteria»
2. «Archaea» (возбудителей инфекций нет).

В домене ***«Bacteria»*** можно выделить 3 основных отдела**:**
- Gracilicutes (от лат. *gracilis*-тонкий, *cutes*-кожа) – бактерии с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные.
- Firmicutes (от лат. *firmus*-прочный) – бактерии с толстой клеточной стенкой, грамположительные.
- Tenericutes (от лат. *tener*-мягкий, нежный) – бактерии без клеточной стенки (класс Mollicutes — микоплазмы)

Домен ***«Archaea»*** включает 1 отдел – Mendosicutes (*mendosus*-ошибочный), это архебактерии, клеточные стенки которых отличаются от таковых структур у прокариот. Архебактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Они имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (рРНК).

Таксономию микроорганизмов производят по следующей **схеме:**
ДОМЕН (НАДЦАРСТВО) – ЦАРСТВО – ОТДЕЛ – СЕКЦИЯ – КЛАСС – ПОРЯДОК – СЕМЕЙСТВО – РОД – ВИД.

Основу таксономии бактерий составляют свойства микроорганизмов:
1. Морфологические (как выглядит микроб под микроскопом);
2. Физиологические (как растет микроб, на чем он выращивается, каковы его свойства на питательных средах, какие вещества ему необходимы для роста);
3. Биохимические (какие ферменты вырабатываются микроорганизмом, какие вещества (углеводы, белки) расщепляются);
4. Молекулярно-биологические (последовательность нуклеотидов в геноме, генетическая особенность отдельных микроорганизмов, на этом основаны современные методы генодиагностики микробов).

Основные понятия, применяемые при таксономии бактерий:

Вид. Одной из основных таксономических категорий является вид *(species).* Вид — это совокупность особей, объединенных по близким свойствам, но отличающихся от других представителей рода.

Для названия вида бактерий рекомендована *бинарная номенклатура*, т. е. название вида состоит из двух слов.

Например, возбудитель сифилиса пишется как *Treponema pallidum.* Первое слово - название **рода (*Treponema*)** и пишется с прописной буквы, второе слово обозначает вид и пишется со строчной буквы. При повторном упоминании вида родовое название сокращается до начальной буквы, например: *T. pallidum.*

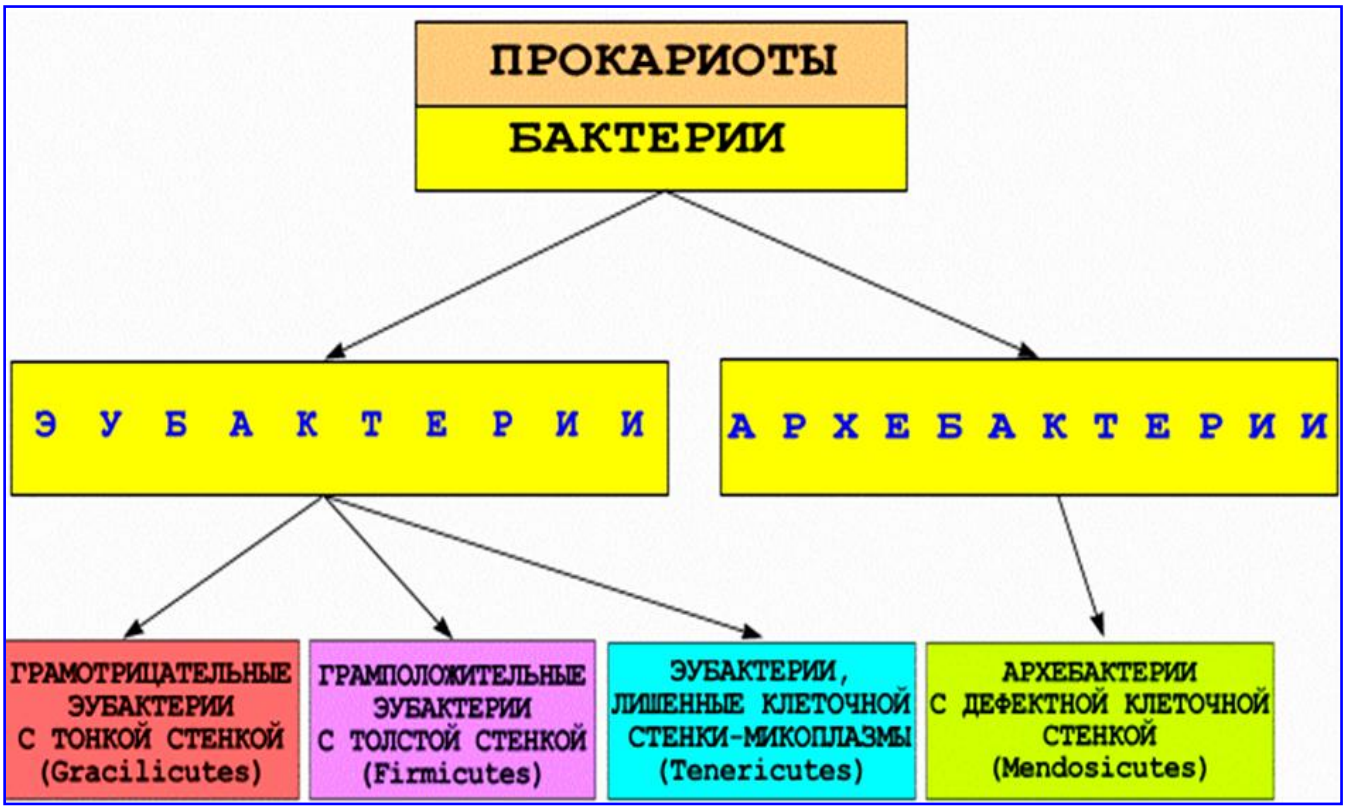


Схема 1 – Классификация бактерий

Чистая культура. Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующихся сходными морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называется чистой культурой.

Штамм. Чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называется штаммом. Штамм — более узкое понятие, чем вид или подвид.

Клон - представляет собой совокупность потомков, выращенных из единственной микробной клетки.

Для обозначения некоторых совокупностей микроорганизмов, отличающихся по тем или иным свойствам, употребляется суффикс ***var*** (разновидность), вместо ранее применявшегося *type*.

Бактерии относятся к *прокариотам*, т.е. доядерным организмам, у них имеется примитивное ядро без оболочки, ядрышка, гистонов, а в цитоплазме отсутствуют высокоорганизованные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и др.). Бактерии (прокариоты) существенно отличаются от клеток растений и животных (эукариоты).

Бактерии (от греч. βακτήριον - «палочка») – мелкие, невидимые невооруженным глазом, одноклеточные прокариотические живые организмы.

Отличия бактерий от других клеток:

1. Бактерии относятся к прокариотам, т.е. не имеют обособленного ядра.

2. В клеточной стенке бактерий содержится особый пептидогликан – муреин.
3. В бактериальной клетке отсутствуют аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, митохондрии.
4. Роль митохондрий выполняют мезосомы – инвагинации цитоплазматической мембраны.
5. В бактериальной клетке много рибосом.
6. У бактерий могут быть специальные органеллы движения – жгутики.
7. Размеры бактерий колеблются от 0,3-0,5 до 5-10 мкм.

Контрольные вопросы:
1. Назовите основные группы микроорганизмов.
2. К какому домену относят истинные бактерии?
3. Какие свойства микроорганизмов составляют основу таксономии бактерий?
4. Дайте пределение бактериям и назовите их особенности.

1.5 Особенности строения бактериальной клетки

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с ультраструктурой и важными органеллами бактериальной клетки.

Задание:
1. Зарисовать строение бактериальной клетки.
2. Знать постоянные и дополнительные компоненты бактериальной клетки.
3. Знать функции органелл бактериальной клетки.

Содержание темы: Для проведения микроскопического метода исследования и правильного применения микроскопа обучающиеся должны иметь представление о строении бактериальной клетки и уметь различать бактерии по морфологическим (форме) признакам.

Ультраструктура бактериальной клетки

Ультраструктура бактерий изучается с помощью электронной микроскопии, а также методом микрохимических исследований.

В строении бактериальной клетки выделяют *следующие органеллы* (рисунок 1): капсула - 1, клеточная стенка - 2, цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) - 3, цитоплазма - 4, нуклеоид - 5, жгутики - 6, рибосомы - 7, мезосомы - 8, плазмида - 9, эндоспора - 10, а также - периплазматическое пространство, включения, ворсинки (пили).

В строении бактерий все органеллы делят на 2 типа: ***основные/***постоянные и ***дополнительные/***не постоянные.

Основные компоненты – обнаруживают у всех бактерий**:** клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид, рибосомы, мезосомы, плазмиды и включения.

Дополнительные компоненты – присущи только некоторым бактериям**:** капсула, эндоспора, жгутики и пили.

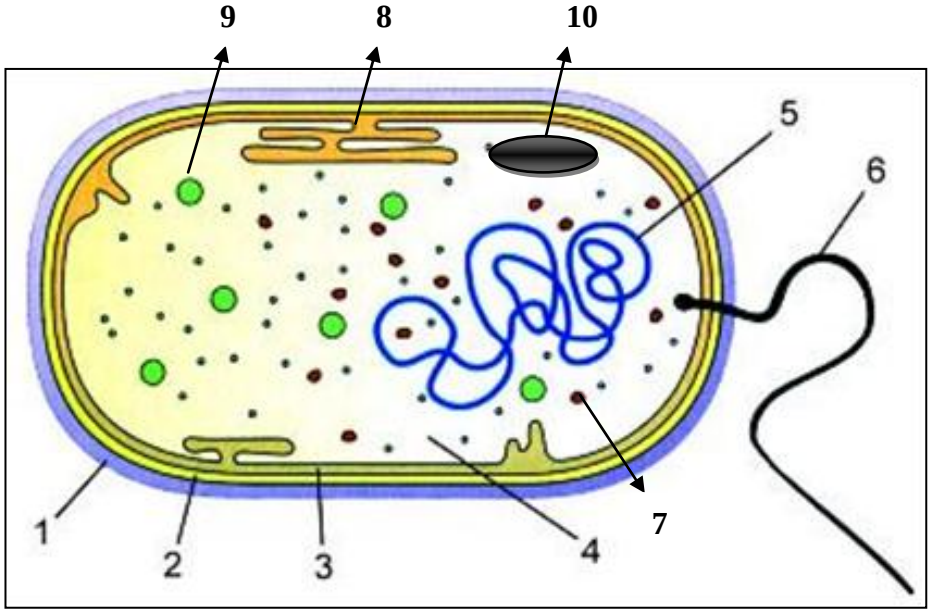


Рисунок 3 - Ультраструктура бактериальной клетки

Основные компоненты бактериальной клетки:

1. Клеточная стенка бактерий

Клеточная стенка - обязательный структурный элемент бактериальной клетки, исключение составляют микоплазмы и L-формы. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки. Функции – структурная (определяет форму бактерий), защитная, транспортная.

Основным компонентом клеточной стенки большинства бактерий является *муреин*, из класса *пептидогликанов.* **Муреин** – гетерополимер, построенный из цепочек, чередующихся ацетилглюкозамина и мурамовой кислоты.

Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий и являются важным диагностическим признаком, который используется для идентификации бактерий.

L-формы бактерий – это бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Буква L – первая буква названия Листеровского института в Лондоне, где впервые обратили внимание на развитие необычных клеток в культуре бактерий

2. Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)

Цитоплазматическая мембрана – представляет собой трехслойную мембрану (толщиной по 2,5 нм): двойной белковый слой и фосфолипидный слой. Химический состав ее представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50–75 %, на долю липидов – 15–50 %.

ЦПМ выполняет ряд существенных для клетки ***функций:***

• поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки. Особенность ЦПМ – она полупроницаема. Она проницаема для воды и низкомолекулярных веществ, но не проницаема для макромолекул и др. соединений.

• с полупроницаемостью ЦПМ связана функция транспорта веществ в клетку и вывод их наружу;

• в ЦПМ локализуются электронтранспортная цепь и ферменты окислительного фосфорилирования;

• цитоплазматическая мембрана связана с синтезом клеточной стенки и капсулы;
• в цитоплазматической мембране закреплены жгутики. Энергетическое обеспечение работы жгутиков связано с цитоплазматической мембраной.

При избыточном росте цитоплазматическая мембрана образует инвагинаты — впячивания в виде сложно закрученных мембранных структур, называемые ***мезосомами.*** Мезосомы бактерий разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: ***ламеллярные*** (пластинчатые), ***везикулярные*** (имеющие форму пузырьков) и ***тубулярные*** (трубчатые).

Между наружной и цитоплазматической мембранами находится периплазматическое пространство, или периплазма, содержащая ферменты (протеазы, липазы, фосфатазы, нуклеазы, бета-лактомазы) и компоненты транспортных систем.

3. Цитоплазма

Цитоплазма – это коллоидное содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Состоит цитоплазма из растворимых белков, РНК, внутрицитоплазматических включений в виде многочисленных мелких гранул — гликогена, полисахаридов, бета-оксимасляной кислоты и полифосфатов (волютин). Они являются запасными веществами для питания и энергетических потребностей бактерий.

4. Рибосомы

Рибосомы – внутриклеточные органоиды клетки, имеющих вид гранул в цитоплазме. Функция рибосом - осуществляют синтез белка (биосинтез).

Рибосомы состоят из белка и трех типов РНК: *информационная* (иРНК), *транспортная* (тРНК) и *рибосомная* (рРНК). Рибосомы образованы двумя субъединицами – 30S и 50S. Меньшая субъединица 30S содержит молекулу 16S-рРНК и по одной молекуле белков 21 вида. Субъединица 50S состоит из двух типов молекул рРНК (23S и 5S) и около 35 молекул различных белков. Рибосомы бактерий имеют константу седиментации - 70S.

На основе изучения 16S рРНК составлена современная систематика бактерий, позволяющая оценить степень родства микроорганизмов.

Бактериальная клетка содержит от 5 до 50 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

5. Нуклеоид

Нуклеоид – генетический материал прокариот. В бактериальной клетке содержится одна хромосома, представленная двунитевой молекулой ДНК, замкнутой в кольцо и плотно уложенной в виде клубка, не имеющей собственной ядерной мембраны. Локализуется в цитоплазме. Функция – хранение и передача наследственной информации, участие в делении клетки.

6. Плазмиды

Плазмиды – внехромосомные генетические элементы, располгаются в цитоплазме клетки. Представляют собой двухцепочечные суперскрученные кольцевые молекулы ДНК. У бактерий бывают плазмиды F-типа, Col-типа, D-плазмиды, R-типа и др. В настоящее время много видов плазмид не изучены.

Плазмиды придают ***бактериальным клеткам*** различные ***признаки:***

1) устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (R-плазмиды);

2) способность вызывать биодеградацию камфоры, ксилола, нафталина, салицилата, толуола, n-алканов и других неприродных и природных соединений (ксенобиотиков). Называются плазмиды биодеградации или D-плазмиды;

3) способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты, инсектициды, гемолизины, токсины, фибринолизины, сероводород, поверхностные антигены;

4) способность использовать в качестве источника углерода различные углеводы и необычные аминокислоты;

5) способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмиды);

6) способность осуществлять модификацию ДНК и др.

7. Включения

Подразделяются на *активно функционирующие* структуры и *продукты клеточного метаболизма,* не выделяющиеся наружу, а откладывающиеся внутри клетки. Обнаружены следующие ***виды***: аэросомы/газовые вакуоли, магнитосомы (у водных бактерий), хлоросомы (у цианобактерий), полиэдрические тела, запасные вещества – полифосфаты (виде волютиновых зерен), полисахариды, жиры (в виде гранул) и сера (у пурпурных серобактерий – в виде шариков).

Дополнительные компоненты бактериальной клетки:

1. Микрокапсула или капсула – поверхностная слизистая структура бактериальной клетки, образующаяся вокруг клеточной стенки. Имеет важное значение для жизнедеятельности клетки.

Функции капсулы:

• защитная – предохраняют бактериальную клетку от неблагоприятных факторов внешней среды (механических повреждений, высыхания и т.п.) и внутренней среды (процессса фагоцитоза);

• создают дополнительный осмотический барьер;

• фактора вирулентности у некоторых бактерий (например, у Streptococcus pneumoniae);

• служат барьером для бактериофагов, препятствуя их адсорбции на клетках бактерий;

• являются источником запасных питательных веществ;

• объединяют клетки в цепочки, микроколонии;

• обеспечивают прикрепление клеток к поверхности субстрата.

В строении капсулы различают два слоя: внутренний и наружный. Внутренний слой – часть наружного слоя цитоплазмы клетки, а наружный – результат секреторной функции бактерии. Бывает 2 вида капсул: Микрокапсулы. Слой слизи меньше 0,2 мкм. Выявляется только с помощью электронного микроскопа. Макрокапсулы, имеющие стенки толще 0,2 мкм. Их уже можно рассмотреть в обычный микроскоп при окрашивании.

2. Эндоспоры бактерий

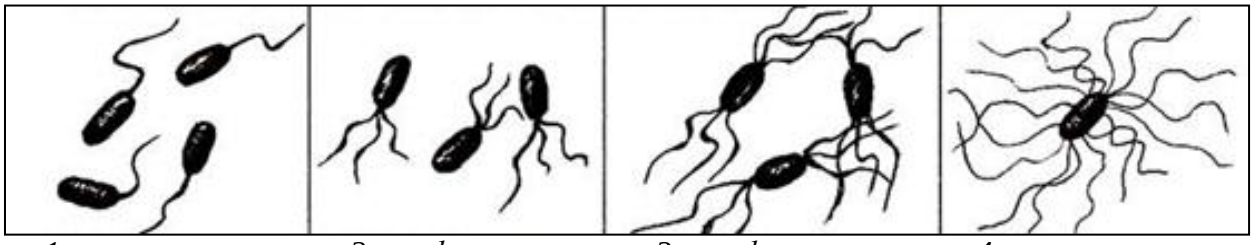
Эндоспора – особый тип покоящихся клеток (в состоянии *анабиоза*), в основном грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются эндогенно, т.е. внутри материнской клетки, которая называется спорангием. Бактериальная *эндоспора* отличается от *вегетативной клетки* тем, что она характеризуется повышенной резистентностью к нагреванию, высоким температурам, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и других факторов. Споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение двух часов, они также могут длительное время (до 50 и более лет) сохраняться в покоящемся состоянии.

3. Жгутики и движение бактерий

Жгутики – орган передвижения у большинства бактерий. Рассмотреть жгутики можно только в электронном микроскопе. В световом микроскопе без специальных методов обработки отдельные жгутики не видны.

По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки выделяют ***4 группы бактерии:***

1. Монотрихи – имеют один жгутик (например, бактерии рода Vibrio);
2. Лофотрихи – имеют на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (например, бактерии родов Pseudomonas, Chromatium);
3. Амфитрихи – имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (например, бактерии рода Spirillum);
4. Перитрихи – большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (например, бактерии вида E.coli и рода Erwinia) (рис. 4).



1 – монотрихи *2 – лофотрихи* *3 – амфитрихи* *4 - перетрихи*

Рисунок 4 – Расположение жгутиков на поверхности бактериальной клетки

Жгутики представляют собой спирально закрученные нити, состоящие из специфического белка флагеллина. Диаметр жгутика 12-20 нм, длина 10-80 мкм, в составе имеются длинные нити белка флагеллина.

4. Пили (фимбрии, ворсинки) бактерий

Пили - нитевидные образования, более тонкие и короткие (ширина 3-10 нм х длинна 0,3-10мкм), чем жгутики. Пили, отходят от поверхности клетки и состоят из белка пилина, обладающего антигенной активностью.

Пили подразделяют: *ответственные за адгезию*, то есть за прикрепление бактерий к поражаемой клетке; *ответственные за питание*, водносолевой обмен и *половые (F-пили), или конъюгационные пили*. Пили многочисленны - несколько сотен на клетку. Однако, половых пилей обычно бывает 1-3 на клетку. Отличительной особенностью половых пилей является взаимодействие

с особыми "мужскими" сферическими бактериофагами, которые интенсивно адсорбируются на половых пилях.

Контрольны вопросы:
1. Назовите основные компоненты (органеллы) клетки бактерий.
2. Функция клеточной стенки бактерий.
3. Виды плазмид и основные свойства, придающие бактериальной клетке.
4. Перечислите основные типы бактерий по наличию жгутиков.
5. Отличие эндоспоры и капсулы у бактерий, их функции.

1.6 Морфология бактерий

Цель занятия. Изучить морфологические особенности бактерий, отличать бактерий по форме.

Задачи:
1 Изучить форму и расположение бактерий.
2 Зарисовать микроскопическую картинку препаратов.
3 Изучить окрашенные препараты под иммерсионной системой микроскопа.

Бактерии по форме клеток делятся на ***основные 3 группы***: шаровидные (кокки), палочковидные и извитые бактерии (рисунок 5).

Рисунок 5 – Основные формы бактерий

Кокки (от греч. *kokkos* – виноград, лат. *coccus* - ягода) – сферической формы бактерии. Среди шаровидных форм, в зависимости от расположения клеток после их деления, различают ***6 видов***:
- *стафилококки* (беспорядочно расположенные клетки, иногда образующие скопления в виде "грозди винограда");
- *диплококки* (располагающиеся попарно);
- *тетракокки* (в результате деления клетки в двух взаимно перпендикулярных направлениях - сохраняются вместе по четыре кокка);
- *стрептококки* (клетки, располагающиеся в виде цепочек различной длины);
- *сарцины* (скопления кокков после их деления в виде " тюков", "пакетов" по 8 или 32 клетки) (рисунок 6).

Шаровидные бактерии:
a) стрептококки;
b) диплококки;
c) тетракокки;
d) сарцины;
e) стафилококки;

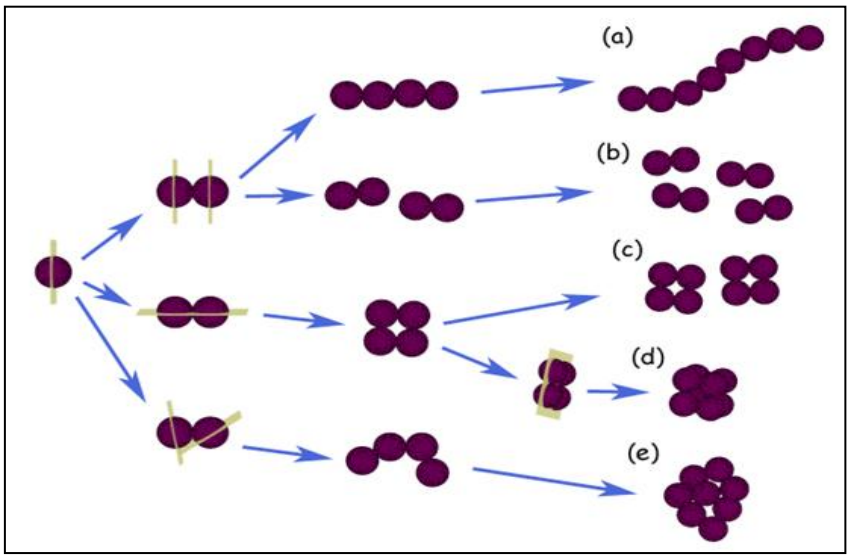


Рисунок 6 – Расположение шаровидных бактерий после деление клеток

Палочковидные бактерии – имеют форму цилиндра, с закругленными или обрубленными концами. Палочковидные бактерии делят на ***две группы***: *собственно бактерии и бациллы.*

Бациллы – это палочковидные бактерии, имеющие в строении *эндоспору*. Например, бациллы сибирской язвы, столбняка, сенная палочка и др.

Это устойчивая форма существования бактерий в окружающей среде, она форма образуется только в определенных условиях обитания (высушивание, высокая температура, дефицит питательных веществ и др.). Например, бактерии рода Bacillus имеют споры, не превышающие диаметр клетки.

Бациллы, образующие спору, диаметр которой больше бацилярной (вегетативной) клетки, называются ***клостридии,*** из-за своей веретенообразной формы. Например, бактерии рода Clostridium (*лат. Clostridium - веретено*).

Споры могут располагаться в центре микробной клетки (центрально – №1,4), ближе к концу клетки (субтерминально - №6) или на конце микробной клетки (терминально – №2,3,5) (рис. 7).

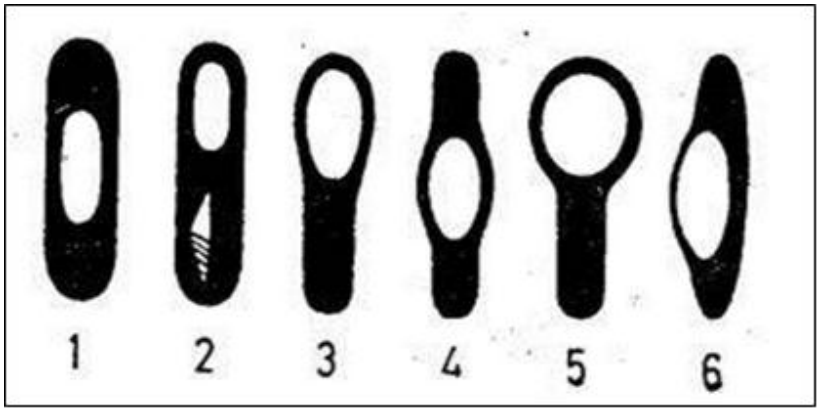


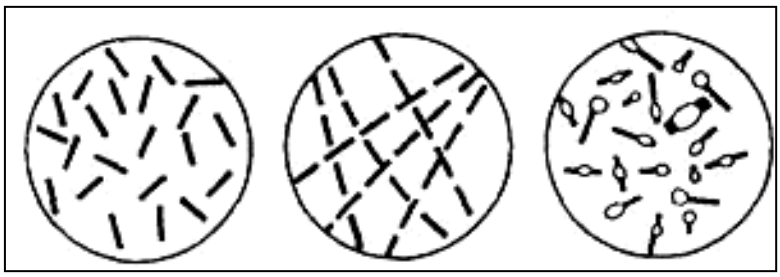
Рисунок 7 – Расположение эндоспор у бацилл и клостридий

Среди палочковидных бактерий встречаются также *фузобактерии* и *коринебактерии*.

Собственно бактерии – неспрообразующие палочковидные бактерии.

Палочковидные бактерии разных видов располагаются одиночно, беспорядочно или в виде цепочек, нитей (стрептобактерии, стрептобациллы). Среди палочкообразных имеются бактерии, которые в старых культурах приобретают разветвленную форму, например микобактерии (возбудители туберкулеза, паратуберкулеза). К одноклеточным ветвящимся бактериям относят также актиномицеты. Обычно эти микроорганизмы имеют дифтероидную форму (с утолщением на концах) или форму V-,Y-,T- образную.

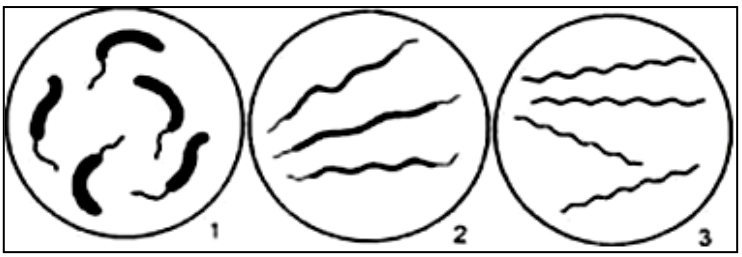
Палочковидные бактерии:
а) собственно бактерии;
б) стрептобактерии;
в) клостридии;



а б в

Извитые бактерии – бактерии имеющие один или несколько завитков. Извитые бактерии также неоднородны. По внешнему виду различают ***3 вида*** извитых бактерий*: вибрионы,* тело которых представляет один не полный завиток, в виде запятой (холерный вибрион); *спириллы* - микроорганизмы, тело которых представляет несколько крупных завитков (3-5 по спирали). Наиболее характерный представитель этой группы - возбудитель болезни содоку (распространенной на Юго-Востоке Азии); *спирохеты,* тело которых представлено множеством спиралевидных завитков вдоль осевой нити. К группе извитых микроорганизмов относится род лептоспир.

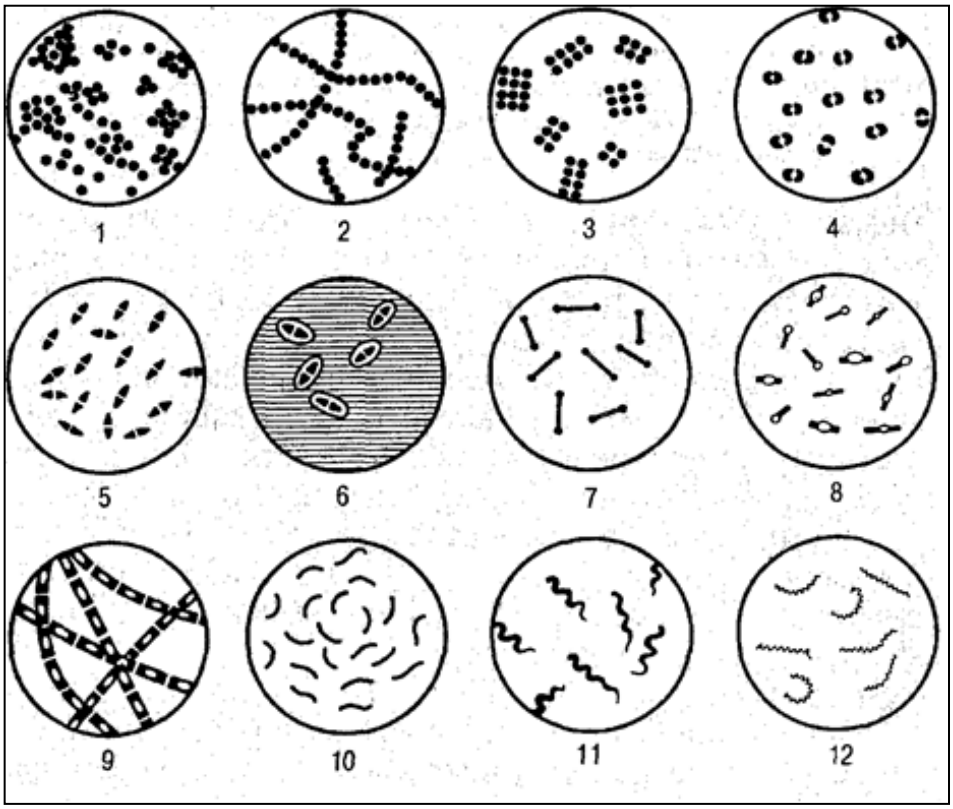
Извитые бактерии:
а) вибрионы (1);
б) спириллы (2);
в) спирохеты (3).



Для большинства бактерий форма их клеток (морфология) является постоянным свойством для определенного вида бактерий. вместе с этим, некоторым бактериям характерно свойство - ***плеоморфизм*** – это изменение морфологических свойств.

Контрольные вопросы:
1. Какие группы шаровидных бактерий различают по их расположению?
2. На чем основано деление бактерий на собственно бактерии, бациллы и клостридии?
3. Какие морфологические группы имеются среди извитых форм?

Задание: Подберите к рисункам названия для основных форм бактерий:



1.7 Химический состав бактериальной клетки

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с особенностями химического состава бактериальной клетки.

Задание:

1 Изучить общую характеристику микроорганизмов.

2 Знать основной химический состав клетки бактерий.

3 Усвоить функции органических веществ микробной клетки.

Общая характеристика микроорганизмов

Специфическая особенность микроорганизмов – это очень мелкие размеры отдельной особи. Диаметр большинства бактерий составляет не более 0,001 мм. В микробиологии единицей измерения бактерий является – ***микрометр*** или ***микрон (мкм),*** 1 мкм $=10^{-3}$мм. Ультраструктуры бактериальной клетки измеряют в ***нанометрах (нм),*** 1 нм = 10^{-3} мкм = 10^{-6} мм, и самая наименьшая единица измерения - ***ангстрем (А)***:

1 мм = 1000 мкм = 1 000 000 нм = 10 000 000 А (рис. 8).

Например, диаметр гифа плесневого грибка достигает 100 мкм; бактерий – 5 мкм; спирохет – 0,14; микоплазм – 0,1; риккетсий – 0,05 мкм.

Общие размеры бактериальных клеток составляют от 0,2 мкм до 10 мкм. Благодаря малым размерам микроорганизмы легко переносятся с потоком воздуха, воды и быстро распространяются в окружающей среде.

Одним из важных свойств микроорганизмов способность к быстрому размножению. Некоторые виды бактерий способны делится каждые 8-10 минут. Например, от одной бактериальной клетки весом $2{,}5 \cdot 10^{-12}$ г, при благоприятных условиях за 2-4 дня может образоваться биомасса до 10 тонн.

Еще одной особенностью бактерий является разнообразие их физиологических и биохимических свойств. Некоторые бактерии остаются жизнеспособными в экстремальных условиях (минус 196^0С - температура жидкого азота и выше $+80^0$С). Есть виды микроорганизмов устойчивые к повышенному гидростатическому давлению (в толще океана и морей), ультрафиолетовым лучам и т.д.

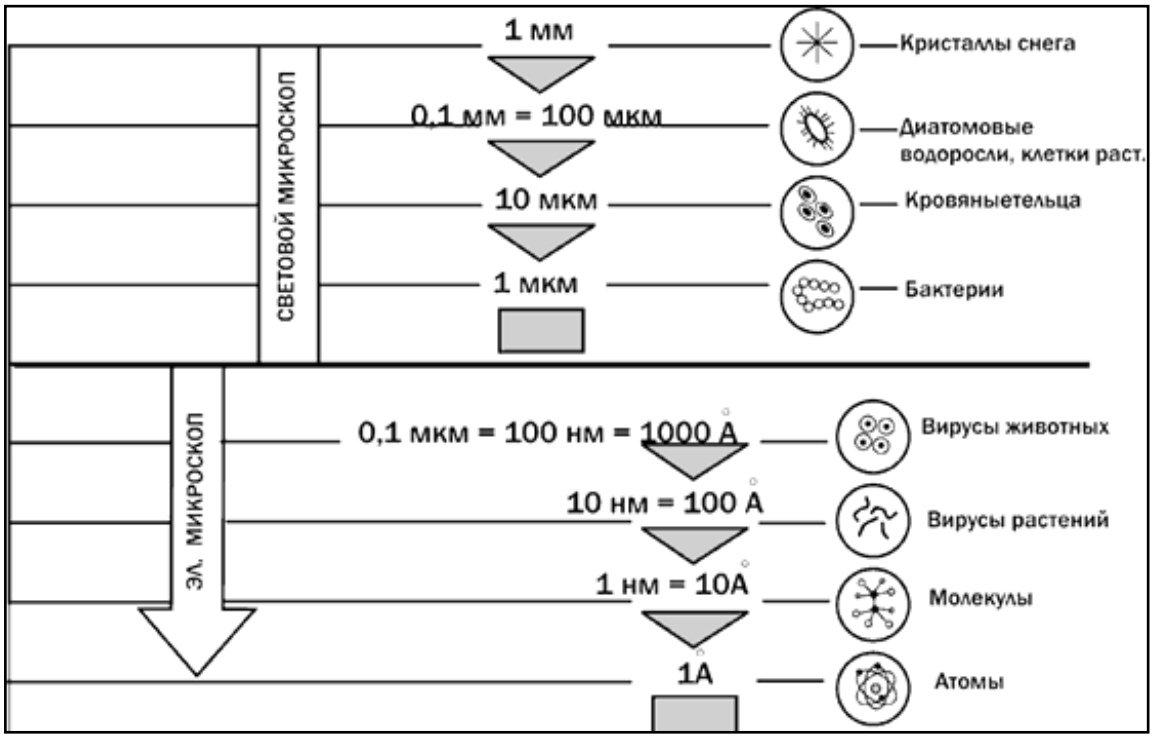


Рисунок 8 – Сравнительная характеристика единиц измерения

Химический состав бактериальной клетки

Химический состав прокариотической клетки схож по составу с эукаритотической клеткой. Клетка бактерий состоит из воды и сухих веществ.

Вода (H_2O) – составляет 75-85% от общей массы бактериальной клетки. Чем моложе клетка, тем больше в ней содержится воды. В спорах бактерий воды содержится значительно меньше, чем в вегетативных клетках. Вода служит средой для многочисленных разнообразных биохимических процессов, таже принимает участие в таких реакциях как гидролиз и окисление. Вода выполняет транспортные функции: обеспечивает поступление питательных веществ внутрь клетки и вывод продуктов жизнедеятельности из неё.

В клетке вода находится в *свободном* и *связанном* состоянии. *Свободная вода* служит дисперсной средой для коллоидов, растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов. Часть воды в клетках *связана с коллоидами* и входит в состав внутриклеточных

органелл. Связанная вода, является структурным растворителем.

Удаление воды из клетки, высушивание приостанавливают процессы метаболизма. При недостатке воды микроорганизмы не размножаются. Высушивание в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) прекращает размножение и способствует длительному сохранению микробных особей.

Сухое вещество (15-25%) – состоит из органических веществ и минеральных элементов. В клетке микроорганизмов важными химическими органогенами являются - углерод, азот, кислород, водород. Они используются для построения белков, углеводов и липидов. На долю органогенов в процентном отношении к сухому веществу приходится: С – 45-55%; N_2 – 8-15%, O_2 - 31%, Н – 6-8%.

Органические вещества (от общей массы сухих веществ составляют 90-92%) – белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды.

Минеральные элементы (5-15% от общей массы сухих веществ) – макро- (S, P, K, Mg, Ca, Fe) и микроэлементты (Cu, Mn, Zn, Mo) тұрады.

Химический состав бактериальной клетки представлена на следующей схеме:

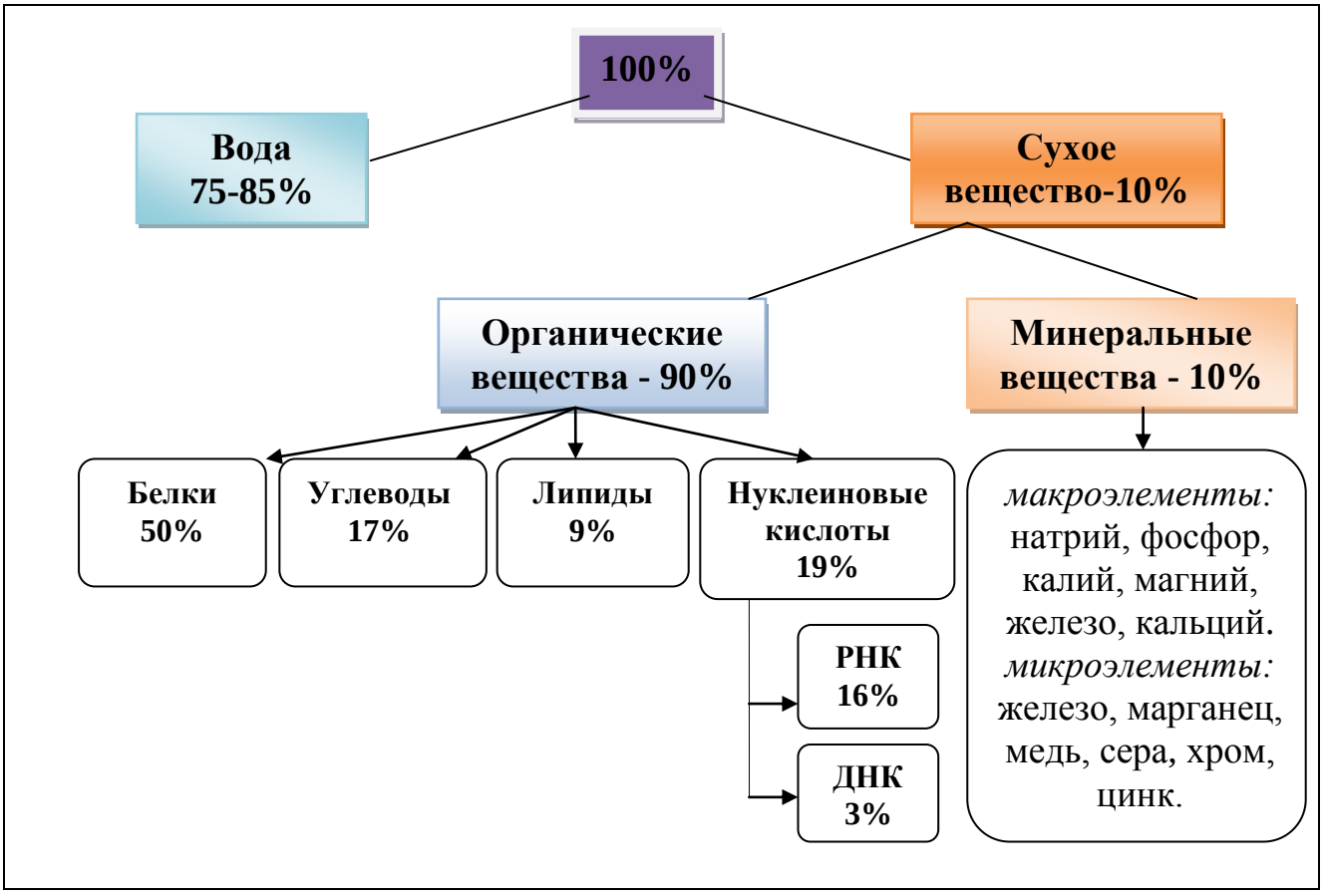


Схема 2 – Химический состав бактериальной клетки

Органические вещества:

Белки - основной жизненно важный элемент микробной клетки. В составе сухого вещества бактерий составляют – 40-80%; в составе микроскопических грибков достигают – 15-40%, дрожжей - 60%.

В клетках микроорганизмов входят простые (*протеины*) и сложные (*протеиды*) белки. Белки выполняют *2 основные функции*: во-первых – входят в состав всех мембран; во-вторых – биохимические катализаторы – *ферменты*.

Роль - белки придают антигенное строение бактериям, выполняют транспортную, защитную, питательную, строительную, двигательную функцию. Среди белков бактерий встречаются опасные вещества – *токсины*.

Нуклеиновые кислоты в составе клетки 2 видов (составляют 10-30%): ДНК и РНК. РНК встречается в ядре и цитоплазме бактерий, а ДНК входит в состав нуклеоида. *Функции:* ДНК – выполняет наследственную функцию; РНК (бывает 3 видов: иРНК-*информационная*, или матричная, тРНК-*транспортная* и рРНК -*рибосомная*) – участвуют в синтезе белка (биосинтез).

Углеводы (составляют 12-18% от сухого вещества) – в бактериальной клетке представлены *простыми* веществами (моно- и дисахариды - глюкоза, фруктоза, рибоза, рамноза, сахароза, галактоза и др.) и *комплексные соединения* (полисахариды - инулин, крахмал, гликоген, декстрин, целлюлоза и др.). А также многоатомные спирты, сорбит, маннит, дульцит. Полисахариды часто входят в состав капсул. Углеводы выполняют энергетическую роль в клетке, и являются запасными питательными веществами.

Липиды (жиры, липоиды) – составляют 3-8% сухого вещества. Входят в состав клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и её производных в клетке. Липиды бактерий представлены фосфолипидами, жирными кислотами и глицеридами. В составе клетке липиды встречаются *в свободном* состоянии (запасные питательные вещества) и *в связанном* состоянии (в составе белков и углеводов). У риккетсий, дрожжей, микобактерий липидов содержится до 40%.

В бактериальной клетки количество белков, углеводов и липидов зависит от вида бактерии и процесса питания.

Минеральные вещества (5-15% от сухого вещества). В структуре клетки всречаются в виде макро- и микроэлементов. *Микроэлементы:* железо, медь, марганец, молибден, кобальт, сера, цинк. *Макроэлементы* - фосфор, натрий, калий, магний и другие. Среди зольных элементов важная роль принадлежит фосфору. Он входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, многих ферментов, а также АТФ (аденозинтрифосфорной кислоты), которая является аккумулятором энергии в клетке, участвует в реакциях энергетического обмена. Натрий участвует в поддержании осмотического давления в клетке. Железо содержится в дыхательных ферментах. Магний входит в состав рибонуклеата магния, который локализован в стенке грамположительных бактерий. Таким образом, минеральные вещества выполняют важную роль в регуляции осмотического давления и поддержании коллоидного состояния цитоплазмы, они входят в состав структурных компонентов микробной клетки.

Вместе с этим в составе микробной клетки обнаружены кислоты и их соли, спирты, пигменты и витамины.

Пигментты (красители)- это специфические фоторецепторные молекулы, вторичные метаболиты, образующиеся на свету и придающие бактериям окраску. Способность к пигментообразованию выражена у родов Sarcina, Micrococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia и др.

Значение пигментов:

- защита от действия видимого света и УФ-лучей;
- ассимилируют углекислый газ;
- обезвреживают токсичные кислородные радикалы;
- участвуют в синтезе витаминов;
- обладают свойствами антибиотиков;
- цвет пигмента используют в идентификации бактерий.

Таблица 1 - Классификация пигментов по химическому составу и цвету

№	Химический состав	Цвет	Пигментообразующие микроорганизмы
1	Хиноновые	Желтый	Микобактерии
2	Азахиноновые (индигоидин)	Синий	Коринеактерии, псевдомоны, артробактерии
3	Каротиноиды	Красный, оранжевый, желтый, белый	Сарцины, актиномицеты, стафилококки, микрококки, коринебактерии, дрожжи
4	Меланиновые	Черный, коричневый	Бактероиды, порфиромоны
5	Пирроловые (продигиозин)	Ярко-красный	Серрации
6	Фенозиновые (пиоцианин)	Сине-зеленый (щелочная среда) или красный (кислая среда)	Синегнойная палочка
7	Пиразиновые (пульхерримин)	Темно-красный	Кандида

Контрольные вопросы:

1 Дать характеристику особенностям микроорганизмов.

2 Основной химический состав бакетриальной клетки?

3 Роль органических веществ в микробной клетке?

4 Виды минеральных веществ, функции?

5 Размеры бактерии измеряются в микрометрах (мкм), один мкм составляет:

А. 1/10 мм.

Б. 1/100 мм.

В. 1/1000 мм.

6. Структурные образования бактериальной клетки измеряются нанометрах (нм), один нм составляет:

А. 1/10 мкм.

Б. 1/100 мкм.
В. 1/1000 мкм.

1.8 Анилиновые красители, их применение в лабораторной практике. Техника приготовления бактериологического препарата.

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с основными видами анилиновых красителей, применяемых в лабораторной практике. Овладеть методикой приготовления препаратов для микроскопии.

Задание:

1 Знать виды анилиновых крастелей, применяемых в бактериологии.

2 Усвоить технику приготовление препаратов-мазков и отпечатков.

3 Приготовить препараты со взвеси бульонной и агаровой культуры.

Материальное оснащение. Чашки Петри с бактериальными культурами. Набор растворов красок – разведенный фуксин, щелочная метиленовая синь; предметные стекла, спиртовки, бактериологические петли, микроскопы.

Анилиновые красители - представляют собой искусственные красители. Это органические соединения, образующиеся при окислении анилина или его солей. Главное вещество – изначально получается из природного индиго и впоследствии подвергается химическому синтезу. Благодаря ему можно изготовить яркие цвета красок. Красители широко используются в лабораторной практике, многие обладают бактерицидным, а некоторые – канцерогенным действием.

Наиболее широко в микробиологии используют анилиновые красители основного и нейтрального характера. Кислые краски для окрашивания бактерий не пригодны (это связано с химическим составом микробной клетки).

В клинической лабораторной диагностике для окраски мазков применяют ограниченный набор красителей:

1) красные (разные оттенки) – фуксин основной, нейтральрот-нейтральный красный, сафранин;

2) синие – синька Леффлера, метиленовый синий;

3) фиолетовые – генциан-виолет, кристаллвиолет, метилвиолет;

4) зеленые – бриллиантовая зелень, малахитовая зелень.

Все применяемые красители поступают в лаборатории в сухом порошкообразном или кристаллическом виде. Из таких красителей, как основной фуксин, генцианвиолет, метиленовая синь, заранее готовят *насыщенные спиртовые растворы*, но к непосредственной окраске они еще не пригодны. Затем из насыщенных спиртовых растворов красителей, добавляя дистиллированную воду, готовят *рабочие спирто-водные растворы красителей*, они менее стойкие, чем насыщенные (чисто спиртовые), их можно применять на протяжении длительного времени. В отдельных случаях готовят *водные растворы красителей* (их сухих красок), правда они не стойкие и используют только в свежеприготовленном виде.

Для усиления действия спиртоводных растворов применяют ***протраву*** (физическую и химическую).

К физической протраве относят нагревание. Для этого пользуются горячим раствором красителя или раствор краски наливают непосредственно на препарат и снизу подогревают над пламенем горелки до появления паров.

При химической протраве - химические вещества для протравливания (фенол, КОН, H_2SO_4) добавляют к рабочим растворам красителей, либо перед окрашиванием препарат-мазок сначала обрабартывают раствором соляной, серной или хромовой кислоты, а затем протраву смывают водой и проводят окрашивание.

Из спиртоводных растворов красителей широко используют карболовый фуксин (фуксин Циля, фуксин Пфейффера), карболовый генциан-виолет, метиленовый синий (щелочной раствор Пфейффера) и водные растворы малахитовой (или бриллиантовой) зелени.

Техника приготовления препаратов для микроскопии

Для изучения свойств бактерий под микросокопом их исследуют *в живом и неживом* состоянии.

Для изучения *морфологии* бактерий (форму и структурные элементы), *тинкториальных особенностей* (способность воспринимать определенный вид красителя) в лабораторной практике применяют окрашивание бактерий ***в неживом состоянии.***

Исследование бактерий в ***живом состоянии*** нашло практическое применение при определении *подвижности микроорганизмов*.

Неокрашенные бактерии при проходящем свете в микроскопе почти сливаются с общим фоном и становятся невидимыми. В неживом состоянии бактерии лучше окрашиваются. Для микрокопирования применяют различные методы окрашивания, которые требуют красителей разного цвета.

Препараты для микроскопии готовят на предметных стеклах. Для работы необходимо иметь специально приготовленные предметные и покровные стекла, которые должны быть чистыми и обезжиренными. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно. На недостаточно обезжиренном стекле вода распадается на мелкие капли.

В зависимости от характера исследуемого материала при его взятии используют бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку. Бактериологическую петлю делают из платиновой или нихромовой проволоки длиной 5-6 см и закрепляют в петледержателе (рис.9). На конце проволоки делают петлю. Петлю держат, как карандаш. Рабочую часть петли стерилизуют в пламени горелки в вертикальном положении, сначала конец петли, затем петледержатель.

Бактериологический препарат бывает **2 видов**: *препарат-отпечаток и препарат-мазок*. Препарат-отпечаток готовят в основном из биоматериала, отправляемого в лабораторию для исследования (кусочки паренхиматозных органов – печень, легкие, сердце и т.д.). Препарат-мазок готовят из жидких материалов (кровь, гной, экссудат, молоко и т.д.), и из готовых бактериальных культур.

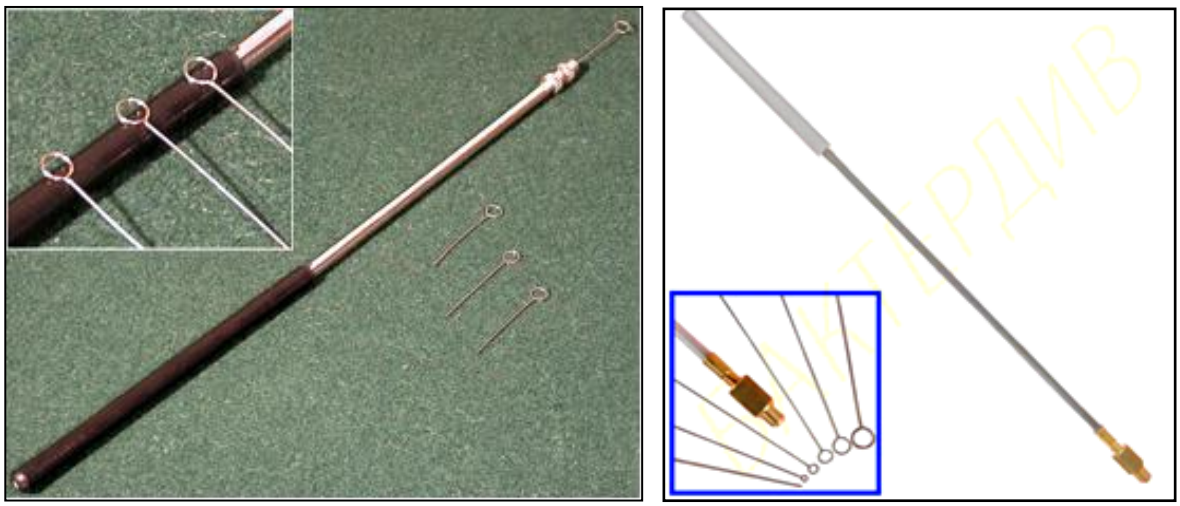
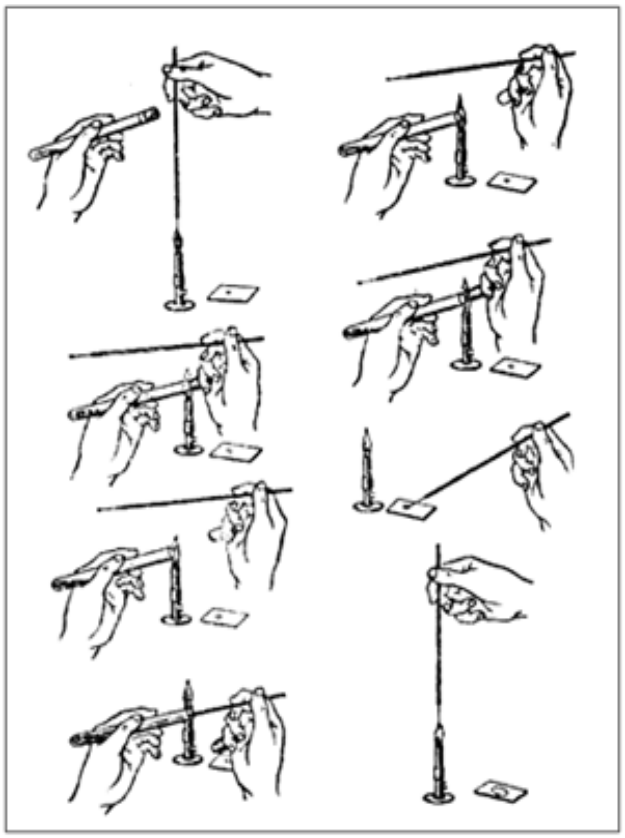


Рисунок 9 – Бактериологическая петля и петледержатель

Приготовление препарата для окрашивания состоит из нескольких этапов (рис. 10): 1) приготовление; 2) высушивание; 3) фиксация; 4) окраска.



1. Приготовление мазка

Из культуры, выращенной на жидкой питательной среде (из пробирки), стерильной петлей берут каплю материала и равномерно распределяют на сухом предметном стекле.

Из культур, выращенных на плотной среде (в чашке Петри), петлей с поверхности берут небольшое количество материала, размешивают в заранее нанесенной на предметное стекло капле дистиллированной воды или физиологического раствора. Получившуюся суспензию (взвесь) равномерно размазывают петлей на площади 1-2 см, по возможности более тонким слоем, чтобы мазок быстрее высыхал после его приготовления.

Рисунок 10 – Приготовление препарата-мазка

Из плотного патологического материала (печень, почки, селезенка и др.) делают мазки-отпечатки. Для этого стерильными ножницами отрезают кусочек органа и прикладывают к предметному стеклу, делая один или несколько отпечатков. Дают отпечатку высохнуть.

Петлю ***после приготовления мазков обязательно прожигают*** *(фламбируют)* над верхней частью пламени горелки, сначала конец петли, затем петледержатель.

На предметном стекле с обратной стороны приготовленного препарата восковым карандашом обозначают место мазка диаметром 2-3 см.

2. Высушивание мазка

Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате.

3. Фиксация мазка

Мазки фиксируют после полного высыхания с целью:

1) закрепить мазок на стекле, чтобы он не смывался при дальнейшей работе;
2) убить бактерии и сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;
3) убитые бактерии лучше воспринимают окраску.

Фиксацию мазков осуществляют одним из *двух способов*: физическим и химическим. ***Физический метод*** заключается в трехкратном проведении обратной стороной мазка через пламя спиртовой горелки, задерживая в пламени на 1-2 секунды.

При химическом способе мазок погружают в жидкости:

а) этиловый спирт 96°-ный на 10-15 минут, или

б) смесь равных объемов спирта и эфира на 10-15 мин, или

в) ацетон - 5 минут.

4. Окраска мазка

Бактерии различно относятся к красителям, эти свойства называют *тинкториальными.*

Контрольные вопросы:

1. Перечислите основные виды анилиновых красителей, применяемых в лабораторной практике.
2. Для чего применяют протраву препаратов, виды протравы?

Задание для самоподготовки и контроля знаний

1. Прокариоты отличаются от эукариотов следующими признаками:

А. Имеют ядро.
Б. Имеют рибосомы.
В. Имеют мезосомы.
Г. Имеют нуклеотид.

2. Найдите каждому описанию бактериальной структуры их функциональные свойства:

1. Мезосомы
2. Рибосомы
3. Нуклеотид
4. Цитоплазматическая мембрана

А. Осуществляет синтез белка.
Б. Участвует в передаче наследственных признаков.
В. Выполняет функцию активного транспорта различных веществ в бактериальную клетку.

Г. Являются центрами дыхательной активности.

3. Установите правильную последовательность этапов при приготовлении препаратов для микроскопии:

А. Изготовление мазка, фиксация, высушивание, окраска.

Б. Изготовление мазка, высушивание, фиксация, окраска.

В. Изготовление мазка, фиксация, высушивание.

4. Фиксация мазков препаратов проводится с целью:

А. Прикрепить мазок к предметному стеклу.

Б. Убить микробы, находящиеся в патматериале.

В. Выявить внутреннюю структуру бактерий.

Г. Фиксировать жгутики.

5. При окрашивании бактерий необходимо хорошо знать цвета красок. Определите, какие краски имеют красный цвет:

А. Генцианвиолет.

Б. Фуксин.

В. Сафранин.

Г. Кристаллвиолет.

6. Для простого метода окрашивания препаратов используют следующие растворы красителей:

А. Метиленовая синь до 5 мин.

Б. Раствор Люголя до 3 мин.

В. Разведенный фуксин 2-3 мин.

Г. Карболовый фуксин до 5 мин.

7. Микроскопия препаратов, приготовленных из биоматериала или бактериальных культур, окрашенных простым методом, позволяет установить:

А. Форму бактерий.

Б. Жгутики.

В. Отсутствие или наличие бактерий.

Г. Капсулу.

Д. Подвижность.

1.9 Способы окраски бактерий. Метод по Граму. Метод Циль-Нильсена. Окраска спор и капсул.

Цель занятия. Изучить основные методы окрашивания бактерий и некоторых структурных элементов бактериальной клетки.

Задание:

1 Освоить простые способы окрашивания препаратов.

2 Окрасить бактерии методом по Граму.

3 Знать технику окраски спор и капсул бактерий.

Материальное оснащение: готовые бактериальные культуры (стафилококки, кишечная палочка); растворы красителей – генцианвиолет, фуксин, метиленовый синий; раствор Люголя, спирт, бактериологические петли, спиртовки, предметные стекла, микроскопы.

Окрашивание микробов не является механическим процессом проникновения краски в микробную клетку. Механизм окраски микробов следует рассматривать, как процесс физико-химический, который зависит от химического состава цитоплазмы микробной клетки.

Этот метод позволяет обнаружить микроорганизмы в препаратах, изучить их ***морфологические особенности, подвижность*** и ***тинкториальные свойства***.

Окраску препаратов производят на специально оборудованном столе, покрытом пластиком или стеклом. На столе должен быть сосуд с дистиллированной водой, емкость для слива красителей, подставка из двух стеклянных трубочек, соединенных с обеих сторон резиновыми трубками (рис. 11), флаконы для красок с пипетками и резиновыми баллончиками.

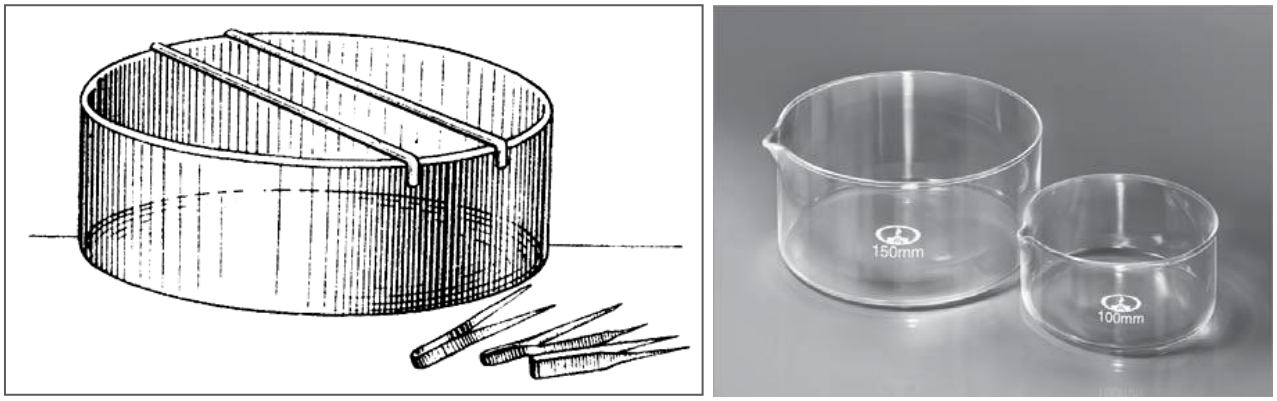


Рисунок 11 – Чаша с подставкой для окраски препаратов

Способы окрашивания микроорганизмов

Способы окрашивания микробов делятся на *простые и сложные* (или дифференцированные).

При ***простом способе*** окраски пользуются только одним красителем: чаще всего красная - фуксин или синяя - метиленовая синька.

Разведенным фуксином красят мазок в течение 1-2 минут; щелочной метиленовой синью Леффлера - в течение 3-5 минут.

Простой метод окрашивания препаратов позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, изучить их морфологию (форму, расположение), а также ознакомиться с общей морфологией грибов.

Ход работы: фиксированный препарат помещают мазком вверх на подставку. На мазок пипеткой наносят краситель так, чтобы он весь был покрыт раствором. По истечении необходимого времени, краситель сливают, препарат промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Оставшуюся на стенке воду, осторожно удаляют фильтровальной бумагой. На сухой мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют препарат иммерсионным объективом микроскопа. Окрашенный мазок должен быть совершенно сухим, так как остаток воды образует с кедровым маслом, нанесенным на мазок, эмульсию, мешающую микроскопированию.

Сложные (дифференциальные) способы окрашивания позволяют обнаружить бактерии в исследуемом материале, изучить их морфологические и тинкториальные особенности. Эти методы дают возможность выявить различия химического состава бактериальной клетки (окраска по Граму), а также установить ее структурные особенности - наличие спор, капсул и др. Все эти признаки учитываются в лабораторной практике при определении вида бактерий.

Сложные методы окрашивания заключаются в том, что применяют несколько реактивов и растворов красителей.

Одним из универсальных методов сложного способа окрашивания является окрашивание по методу Грама. Он был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом.

Окраска по Граму

Это универсальный дифференциально-диагностический метод окраски. Все бактерии по своему отношению к окраске этим способом делятся на две группы:

- *грамположительные / грампозитивные (Г+)*
- *грамотрицательные / грамнегативные (Г-)*

Отношение к окраске по Граму является настолько важным опознавательным и идентифицирующим признаком бактерий, что обязательно упоминается в их характеристике.

Пример: к грамположительным бактериям относятся: *Bacillus subtilis, Sarcina ventriculi, Streptococcus lactis, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Micrococcus luteus* и др. Грамотрицательными бактериями являются: *Escherichia coli, Salmonella enterica, Proteus vulgaris, Yersinia pestis, Pseudomonas aeruginosa* и другие.

Сущность метода:

Этот метод основан на различной способности бактерий удерживать в клеточной стенке красители – кристалвиолет или генциановый фиолетовый, что в свою очередь зависит от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий. Именно от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные.

Клеточная стенка грамположительных бактерий – представляет гомогенный плотный слой, толщиной 20-80 нм. Основным компонентом является многослойный пептидогликан – муреин, который составляет 50-90 % массы клеточной стенки. С муреином связаны полимеры - тейхоевые кислоты. Также содержится незначительное количество полисахаридов, липидов, белков.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14-17 нм. Внутренний слой клеточной стенки представлен муреином, на долю которого приходится 1-10 % ее сухой массы. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поэтому поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в каркасе грамположительных бактерий. Одной из отличительных особенностей грамотрицательных бактерий является отсутствие *тейхоевых кислот* в их клеточной стенке. Также в строении клеточной стенки

грамотрицательных бактерий содержится много белков, фосфолипидов и липополисахаридов.

Техника окрашивания состоит в следующем:

Метод Грама

1) На фиксированный мазок накладывают небольшой кусочек фильтровальной бумаги, заранее пропитанный раствором генцианвиолета (модификация А.В. Синева) и смачивают дистиллированной водой. Окраска продолжается в течение 2 минут.
2) Фильтровальную бумагу с генцианвиолетом удаляют и на мазок наносят несколько капель раствора Люголя на 2 минуты (мазок чернеет).
3) Сливают люголевский раствор и действуют 96°-ным спиртом - 30 секунд.
4) Мазок промывают водой.
5) Дополнительно окрашивают разведенным фуксином до 1 минуты.
6) Промывают водой, высушивают между листами фильтровальной бумаги.

На высушенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют под иммерсионным объективом (×100, ×90) в световом микроскопе.

Микроскопическая картина:

Грамположительные бактерии - окрашиваются ***в темно-фиолетовый цвет.***
Грамотрицательные бактерии - ***в розовый цвет (до красного).***

Механизм окрашивания: у грамположительных бактерий содержится значительное количество магниевой соли рибонуклеопротеида (белки соединенные с РНК в цитоплазме) и пептидогликана в клеточной стенке. Поэтому при обработке препарата генцианвиолетом и раствором Люголя у таких бактерий образуется прочное соединение красителя и йода - нерастворимый комплекс. При обработке спиртом это соединение удерживается и не обесцвечивается спиртом, сохраняется фиолетовая краска (микробы окрашиваются в цвет генцианвиолета - фиолетовый).

У других видов бактерий, не содержащих магниевую соль РНК, прочного соединения с генцианвиолетом не образуется, клетки легко обесцвечиваются 96% спиртом, и при дополнительной окраске раствором фуксина Пфейффера легко окрашиваются в розово-красный цвет (грамотрицательные).

Шарообразные формы микроорганизмов в большинстве красятся по Граму положительно, извитые формы – отрицательно, а палочковидные формы встречаются как грамположительные, так и грамотрицательные.

Методика окраски кислотоустойчивых бактерий

Для окраски группы кислотоустойчивых бактерий, в лабораторной праткике применяют специальный метод окрашивания - по Циль-Нильсену**.**

Метод Циль-Нильсена

Этот метод предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза - Mycobacterium tuberculosis, M.bovis, M.avium, и лепры) от некислотоустойчивых.

1) На фиксированный мазок наливают карболовый фуксин Циля *(основной краситель)* и нагревают над пламенем горелки до появления паров 3-5 минут.
2) Когда препарат остынет, сливают краситель и промывают водой.

3) Обесцвечивают препарат, погружая в 5% раствор серной кислоты *(дифференцирующее вещество)* на 1-2 минуты????.
3) Тщательно промывают препарат водой.
4) Докрашивают метиленовым синим *(дополнительный краситель)* - 3-5 минут.
5) Промывают водой, подсушивают и мкироскопируют.

Микроскопическая картина:

- *Кислотоустойчивые бактерии* – окрашиваются в ***красный цвет***.
- *Некислотоустойчивые бактерии* - ***в голубой цвет.***

Механизм окрашивания: клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов (до 40%), воска и оксикислот. Такие микроорганизмы плохо окрашиваются разведёнными растворами красителей. Для облегчения проникновения красителя в клетку бактерий, нанесённого на препарат, его подогревают над пламенем горелки. Основной краситель удерживается при обесцвечивании мазка кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

Методы окраски капсул бактерий

Некоторые виды патогенных бактерий в инфицированном организме способны образовывать вокруг себя слизистый слой, который называют капсулой. Капсулу образуют возбудители сибирской язвы, диплококковой септицемии и др.

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*.

Физиологическое значение капсулы у патогенных микробов определяют как защиту от влияния факторов иммунитета организма. Будучи окружены капсулой, они слабее фагоцитируются и устойчивы к действию антител. У патогенных видов микробов капсула образуется в инфицированном организме. Обнаружение капсулы у бактерии является видовым признаком. Особое значение это имеет при бактериологической диагностике сибирской язвы – по результатам такого исследования немедленно дают предварительный ответ.

Для исследования наличия капсулы у бактерий из исследуемого материала (кусочки органов, кровь павшего животного) готовят мазки - отпечатки.

Существует несколько ***методов окраски капсул*** бактерий:
метод Михина, метод Бурри-Гинса, Романовского-Гимза, метод Ольта - окраска сафранином и т.д.

- **Окраска капсул по Михину**

1) На фиксированный мазок (кровь, мазки-отпечатки из тканей) наливают метиленовую синьку Лёффлера. *(метиленовая синька Лёффлера – 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего растворяют в 100 мл воды, к нему добавляют 1 мл 1% раствора NaOH, и инкубируют 1 месяц в термостате);*

2) В течение 5-7 минут мазок подогревают над пламенем горелки, после краситель сливают;
3) После тщательно промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.
Микроскопическая картина:
Капсула – розового цвета.
Бактериальная клетка – синего цвета.

- **Метод Романовского-Гимза**

1) Фиксированный мазок-отпечаток помещают мазком вниз в чашку Петри, на дне которой устанавливают подставки (спички). Под препарат наливают краску Гимзе. Краску предварительно разводят дистиллированной водой 1:10.
2) Окрашивают разведенной краской Гимзе 50-60 мин.
3) Промывают водой, высушивают и микроскопируют.
Микроскопическая картина:
Капсула – бледно-розового цвета.
Бактериальная клетка – синего цвета.

- **Метод Бурри-Гинса**

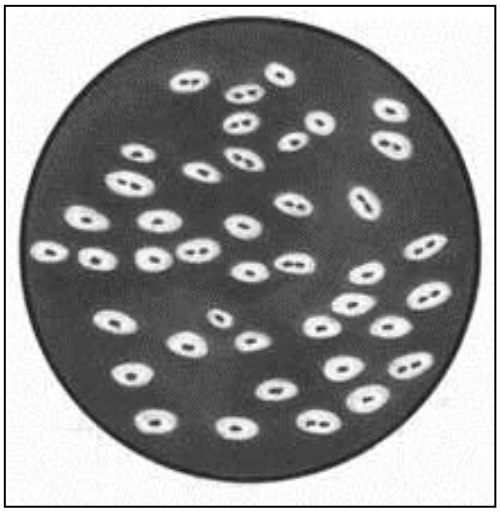


Рисунок 12 – Окраска капсул по методу Бурри-Гинса

Является негативным методом окраски: окрашивается фон, а не сами бактерии. Для этого используют тушь.
1) На середину предметного стекла наносят каплю черной туши и смешивают ее с помощью петли с каплей культуры бактерий *(по Бурри);*
2) Краем другого предметного стекла делают мазок по типу кровяного. Сушат на воздухе и фиксируют над пламенем горелки;
3) После окрашивают 5-10 минут карболовым фуксином *(по Гинсу);*
4) Осторожно промывают водой, высушивают, микроскопируют.

Микроскопическая картина:
Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выделяются на темном фоне препарата (рис. 12).

Методы окраски эндоспор бактерий

Некоторые виды микроорганизмов при неблагоприятных условиях их существования образуют *споровую форму.* Процесс спорообразования сопровождается значительной потерей бактериальной клеткой свободной воды, уплотнением цитоплазмы. Эндоспора образуется внутри бактериальной клетки. Оболочка эндоспоры пропитана особыми смолистыми веществами, которые

значительно снижают ее проницаемость. Внутри одной микробной клетки имеется лишь одна эндоспора, и из нее развивается только одна бактериальная (вегетативная) клетка. *Спорообразование у бактерии не является средством размножения, а имеет защитный характер - форма сохранения их вида*. Эндоспоры устойчивы к внешним факторам воздействия окружающей среды (физические, химические).

Вследствие непроницаемости оболочки споры не воспринимают простого окрашивания. Однако при воздействии соляной кислоты оболочка теряет устойчивость, и поэтому краска проникает в споры. Для окраски спор используют специальные сильнодействующие красящие растворы или применяют предварительное химическое протравливание оболочек спор.

К окраске спор в лабораторной практике прибегают сравнительно редко. Обычно ограничиваются обнаружением непрокрашиваемых округлых или овальных образований внутри бактериальных клеток при окраске простым методом или по Граму.

Существует несколько ***методов окраски эндоспор*** бактерий, среди них наиболее часто употребляемые – методы Меллера, Ожешко, Пешкова и т.д.

- **метод Меллера**

1) Фиксированный мазок протравляют 5%-ной хромовой кислотой 2-3 минуты, (для улучшения впитывания красителя), после промывают водой;
2) Высушивают фильтровальной бумагой, окрашивают карболовым фуксином. Во избежание попадания осадка краски, на мазок предварительно накладывают листок фильтровальной бумаги, а на него уже наносят краску.
3) Препарат снизу подогревают до появления паров, окрашивают 7-8 мин.;
4) Краску с листком бумаги сливают, не промывая водой, обрабатывают 5%-ным раствором серной кислоты 5-7 секунд, после промывают водой;
5) Дополнительно окрашивают метиленовой синью 4-5 мин, вновь промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой, микроскопируют.
Микроскопическая картина:
Эндоспоры – окрашиваются в розово-красный цвет,
Вегетативные клетки – в синий цвет.

- **метод Ожешко**

1) Не фиксированный мазок погружают для протравы на 2-3 минуты в чашку с 0,5 % соляной кислотой и подогревают на пламени горелки.
2) После этого мазок промывают водой, обсушивают, фиксируют над пламенем и красят карболовым фуксином Циля через фильтровальную бумажку с подогреванием - 3 минуты.
3) Остывший освобожденный от бумажки препарат обесцвечивают 5% серной кислотой, смывают водой
4) Докрашивают метиленовой синькой в течение 3-5 минут, затем смывают водой и высушивают.
Микроскопическая картина:
Эндоспоры – принимают ярко-красный цвет фуксина.
Вегетативное тело бактерий - окрашивается в синий цвет.

- **метод Пешкова**

М.А. Пешков предложил окрашивать споры синькой Леффлера, причем для изменения устойчивости оболочки он применяет кипячение.

1. На фиксированный мазок наносят метиленовую синьку Леффлера и кипятят на пламени спиртовой горелки 15-20 секунд.
2. Остывший препарат смывают водой и докрашивают 0,5% водным раствором нейтральрот, в течение 30 секунд.
3. Смывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

Микроскопическая картина:

Эндоспоры - окрашиваются в голубой/синий цвет.

Протоплазма вегетативного тела бактерий – розово-красная.

1.10 Вопросы для самоподготовки и контроля знаний 1:

1. Бактерии по-разному окрашиваются по методу Грама (Г+ и Г–), потому что:
A) Имеют капсулу.
B) Различаются по форме клеток.
C) Различаются по структуре и химическому составу клеточной стенки.
D) Имеют различный состав химический цитоплазмы.

2. Какими структурно-химическими особенностями обладает клеточная стенка грамположительных бактерий в отличие от грамотрицательных?
A) Содержит фосфолипиды.
B) Содержит липопротеины.
C) Имеет пептидогликан до 90% и многочисленные извитые канальца.

3. Выберите правильную последовательность красок и реактивов, необходимых для окраски препарата по Граму:
A) Генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, разведенный фуксин.
B) Разведенный фуксин, раствор Люголя, генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой.
C) Генцианвиолет, раствор Люголя, обесцвечивание спиртом, промывание водой, разведенный фуксин.
D) Обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, генцианвиолет, разведенный фуксин.

4. При окраске препарата по Граму, приготовленного из известной культуры грамположительных бактерий, допущена одна неточность, в результате чего при микроскопии обнаружены бактерии, окрашенные в красный цвет. Найти вероятную причину неправильной окраски бактерий:
A) Длительная окраска генцианвиолетом.
B) Длительное обесцвечивание спиртом.
C) Кратковременная окраска разведенным фуксином.
D) Длительная обработка раствором Люголя.

5. При окраске препарата по Граму, приготовленного из известной культуры грамотрицательных бактерий, допущена одна неточность, в результате чего при

микроскопии обнаружены бактерии, окрашенные в фиолетовый цвет. Найти вероятную причину неправильной окраски бактерий:
A) Длительная окраска генцианвиолетом.
B) Кратковременное обесцвечивание спиртом.
C) Длительная окраска разведенным фуксином.
D) Длительная обработка раствором Люголя.
6. При исследовании материала в препаратах-мазках окрашенных по Граму, обнаружены фиолетового цвета кокки. С чем связано различие в окраске микроорганизмов по методу Грама?
A) Соотношении ДНК и РНК
B) Особенностей ядерной субстанции
C) Морфологией бактерий
D) Изоэлектрической точки
E) Наличия магниевой соли РНК
7. Бактерии – это одноклеточные организмы, способные к автономному существованию. Какие структуры бактерий играют основную роль в процессе синтеза белка?
A) Мезосомы
B). Рибосомы
C) Цитоплазма
D) Цитоплазматическая мембрана
E) Включение цитоплазмы
8. При микроскопии мазков из мокроты больного обнаружены диплококки сине-фиолетового цвета формы. Каким методом были окрашены мазки?
A) Бурри-Гинса
B) Меллера
C) Морозова
D) Грама
E) Ожешко
9. В препарате, приготовленном из содержимого раны, бактериолог обнаружил крупные палочки синего цвета с терминально расположенной спорой красного цвета. Какой метод окраски использовал бактериолог?
A) Михина
B) Ожешко
C) Бурри-Гинса
D) Грама
E) Циля-Нильсена
10. В мазке, приготовленном из гноя больного, выявлены грамположительные шаровидной формы бактерии, которые расположены в виде цепочек. Какие бактерии можно считать возбудителем заболевания?
A) Диплококки
B) Стрептококки
C) Стафилококки
D) Сарцины
E) Тетракокки.

Вопросы для самоподготовки и контроля знаний 2:

1. Для чего у бактерий служат споры:

A) Размножения.

B) Сохранения вида в неблагоприятных условиях.

C) Передвижения.

D) Адгезии.

2. Выберите правильную последовательность красок и реактивов, необходимых для окраски спор по методу Златогорова:

A) Метиленовая синь, обесцвечивание раствором серной кислоты, промывание водой, карболовый фуксин с подогреванием.

B)Карболовый фуксин с подогреванием, промывание водой, обесцвечивание раствором серной кислоты, метиленовая синь.

C) Карболовый фуксин с подогреванием, обесцвечивание раствором серной кислоты, промывание водой, метиленовая синь.

D) Метиленовая синь с подогреванием, обесцвечивание раствором серной кислоты, промывание водой, карболовый фуксин.

3. При микроскопии препарата, приготовленного из споровой культуры сенной палочки и окрашенного по методу Златогорова, обнаружено: вегетативные клетки окрашены в синий цвет, споры бесцветные. Найти вероятную ошибку, которая была допущена при окраске препарата:

A) Кратковременная окраска метиленовой синью.

B) Кратковременное обесцвечивание раствором серной кислоты.

C) Длительное обесцвечивание раствором серной кислоты.

D) Длительная окраска карболовым фуксином.

4. Макрокапсула у патогенных бактерий служит для:

A) Защиты от фагоцитоза.

B) Сохранения наследственной информации.

C) Защиты от бактерицидных факторов крови.

D) Адгезии.

5. Для выявления капсулы у бактерий используют методы окраски:

A) По Граму.

B) По Златогорову.

C) По Пешкову.

D) По Михину.

6. Определите правильность тинкториальных признаков у капсулообразующего микроба возбудителя сибирской язвы, окрашенного по методу Ольта (препарат приготовлен из крови животного, павшего от сибирской язвы):

A) Капсула – желтого, вегетативная клетка – кирпично-красного цвета.

B) Капсула кирпично-красного цвета, вегетативная клетка – желтого цвета.

C) Капсула розового, вегетативная клетка кирпично-красного цвета.

7. Назовите, в чем заключается физический метод фиксации?

A) Обработка мазка 5% серной кислотой

B) Высушивании мазка на воздухе

C) Погружении мазка в спирт

D) Проведении мазка через пламя горелки

В. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериологический метод является *важнейшим* в практической деятельности любой микробиологической лаборатории. Бактериологические исследования проводятся с целью выделения чистой культуры возбудителя с установлением его морфологических, тинкториальных, культурально-биохимических свойств, а в ряде случаев антигенной структуры. Проводят идентификацию вида бактерий по серотипу и серогруппам.

Для освоения бактериологического метода необходимо **знать:**

- классификацию и виды питательных сред;
- технику приготовления и стерилизацию питательных сред;
- технику посевов микроорганизмов на плотные и жидкие среды;
- выделение чистых культур бактерий (аэробов и анаэробов);
- изучение культуральных свойств бактерий на жидких и плотных питательных средах;
- изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий;
- определение чувствительности бактерий к антибиотикам.
- исследование бактерий на подвижность в препаратах «висячая» или «раздавленная» капля, приготовленных из чистых культур выделенных бактерий.

1.11 Питательные среды, классификация и их применение в бактериологии. Техника посевов микроорганизмов

Цель занятия. Ознакомиться с видами питательных сред, их назначением и применением. Изучить технику посевов микроорганизмов.

Задание:

1. Знать основные питательные среды.
2. Способы приготовления исскуственных питательных сред.
3. Знать основные требования предъявляемые к питательным средам.

Материальное оснащение: сухие порошкообразные питательные среды - МПА, МПБ, среда Эндо и Левина; весы, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, стерильные чашки Петри, колбы, автоклав.

Для выращивания микроорганизмов в лаборатории необходимы особые субстраты – питательные среды, где бактерии осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.).

Питательные среды – это субстрат, применяемый в бактериологических лабораториях для выращивания микроорганизмов в исскуственных условиях.

Микроорганизмы, выращенные на питательных средах называют – ***бактериальной культурой***, процесс выращивания бактерий в искусственных условиях (*in vitro*) на питательых средах называется - ***культивирование***.

Питательные среды необходимы для выделения, накопления, сохранения, изучения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов. Они должны включать в себя все компоненты, необходимые для конструктивных и

энергетических процессов бактериальной клетки, т.е. должны иметь источники углерода, азота, кислорода, водорода, макро- и микроэлементы, «факторы роста» (витамины).

Для культивирования необходимы следующие основные условия: оптимальный температурный режим с учетом, к какой группе относится исследуемый вид бактерий (мезофиллы, термофиллы, психрофиллы), и соответствующие питательные среды.

Классификация питательных сред:

- По консистенции (плотности):

а) жидкие;

б) полужидкие;

в) плотные / твердые.

В бактериологической практике плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно вещество - *агар-агар или желатин*.

Агар-агар – полисахарид (студенистое вещество), получаемый путём экстрагирования из красных и бурых водорослей, произрастающих в Чёрном море, Белом море и Тихом океане. Он образует в водных растворах плотный студень. Это не питательное вещество для микроорганизмов, он только лишь придает питательной среде уплотнение.

В воде агар плавится при 80-100^{0}С, застывает при t = 40-45^{0}С.

Желатин – белок животного происхождения. При 25-30°С желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при pH ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают.

Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с селикагелем.

- По происхождению (по исходным компонентам):

а) натуральные среды – готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, кормовые дрожжи, молоко, сок овощей, МПА, МПБ);

б) синтетические среды – готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен.

- По составу:

а) простые – мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), питательный желатин (МПЖ), бульон и агар Хоттингера, и пептонную воду;

б) сложные – многокомпонентные среды, которые могут содержать аминокислоты, витамины, микроэлементы, сыворотку и другие вещества.

- По назначению:

а) основные / универсальные среды – служат для культивирования большинства микроорганизмов, например, МПА, МПБ, бульон Хоттингера;

б) специальные **–** служат для выделения и выращивания микроорганизмов не растущих на простых питательных средах. Например, для культивирования туберкулезной палочки применяют – среду Левенштейн-Йенсена, для культивирования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмо- и менингококков - сыворотку крови, для возбудителя коклюша - кровь;

в) элективные (избирательные) среды **–** служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Такие среды готовятся при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении pH. Жидкие элективные среды называются *накопительной средой*. Например, соли желчных кислот, подавляя рост кишечной палочки, делают среду элективной для возбудителя брюшного тифа; среда Мюллера, селенитовый бульон – используют для выделения сальмонелл, для энтеробактерияларды – среду Рапопорт и т.д.

г) селективные среды - на которых микроорганизмы определенного вида растут быстрее, более интенсивно и опережают в своем развитии другие виды бактерий. Например, 1% щелочная пептонная вода является селективной средой для холерных вибрионов; *Palcam*-агар – для листерий, среда Леффлера для выделения колибактерий и т.д.

д) дифференциально-диагностические среды – они позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности, определить видовые и родовые особенности бактерий. Например, среды Гисса с углеводами и индикатором - при росте микроорганизмов, расщепляющих углеводы, изменяется цвет среды; молоко и МПЖ – при росте бактерий расщепляющих белки, среда сворачивается или разжижается и т.д.

е) транспортные (или консервирующие) – предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала. Например, глицериновая смесь, используется для транспортировки биоматериала, с целью обнаружения ряда кишечных бактерий.

Питательные среды должны соответствовать следующим требованиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят *факторы роста* - витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать; Микроорганизмы, нуждаются в большом количестве воды.

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов - pH, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2-7,4). Бывают исключения, например, холерный вибрион - его оптимум в щелочной зоне (pH 8,5-9,0), возбудитель туберкулеза - слабокислая pH 6,2-6,8.

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили pH, ***среды должны обладать буферностью,*** т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки; т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства бактерий оптимальная среда соответствует 0,5% раствору натрия хлорида;
4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды;
5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;
6) быть унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8-1,2 г/л аминного азота NH_2; 2,5-3,0 г/л общего азота N; 0,5% натрия хлорид; 1% пептона.

Желательно, чтобы среды были прозрачными - удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Приготовление питательных сред

В современной практике широкое применение нашли ***готовые сухие среды***. Их выпускают промышленные биофабрики. Сухие среды бывают разного назначения: простые, элективные, дифференциально-диагностические, специальные. Это порошки во флаконах с крышками (рис. 13). Хранят сухие среды в темном месте, плотно закрытыми, они гигроскопичны. В лаборатории из порошков готовят среды по прописи на этикетке (способ приготовления).

Преимущество сухих сред по сравнению со средами, изготовленными непосредственно из натуральных компонентов, - стандартность (их выпускают большими партиями), простота приготовления, стабильность, экономичность.

Рисунок 13 – Виды питательных сред

Иногда, в лабораториях среды готовят непосредственно из сырья. Исходным сырьем для приготовления большинства сред служат продукты животного или растительного происхождения: мясо и его заменители, молоко, яйца, картофель, соя, кукуруза, дрожжи и др. Основные питательные бульоны

готовят на мясной воде или на различных переварах, полученных при кислотном или ферментативном гидролизе исходного сырья. Бульоны из переваров в 5-10 раз экономичнее, чем из мясной воды. Среды на переварах богаче аминокислотами, следовательно, питательнее; обладают большей буферностью, т. е. имеют более стабильную величину pH. Кроме того, перевары можно готовить из заменителей мяса (сгустков крови, плаценты, казеина и т. д.).

Этапы приготовления сред: 1) варка; 2) установление оптимальной величины pH; 3) осветление; 4) фильтрация; 5) разлив; 6) стерилизация; 7) контроль.

Техника посевов микроорганизмов

Важным этапом бактериологического исследования является **посев.**

Посевы осуществляют как из присылаемого в лабораторию материала, так и из уже имеющихся бактериальных культур.

В зависимости от цели исследования, характера посевного материала и среды используют разные методы посева. Все они включают обязательную цель: оградить посев от посторонних микробов. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, усиливающих колебания воздуха. Во время посевов нельзя разговаривать. Посевы лучше делать в боксе и обязательно над пламенем горелки.

Посевы из проб материала, поступившего в лабораторию, проводят пастеровской пипеткой, из бактериальной массы - бактериологической петлей (рис. 14). На засеваемых чашках Петри, колбах или пробирках пишут номер экспертизы, под которым зарегистрирован поступивший материал.

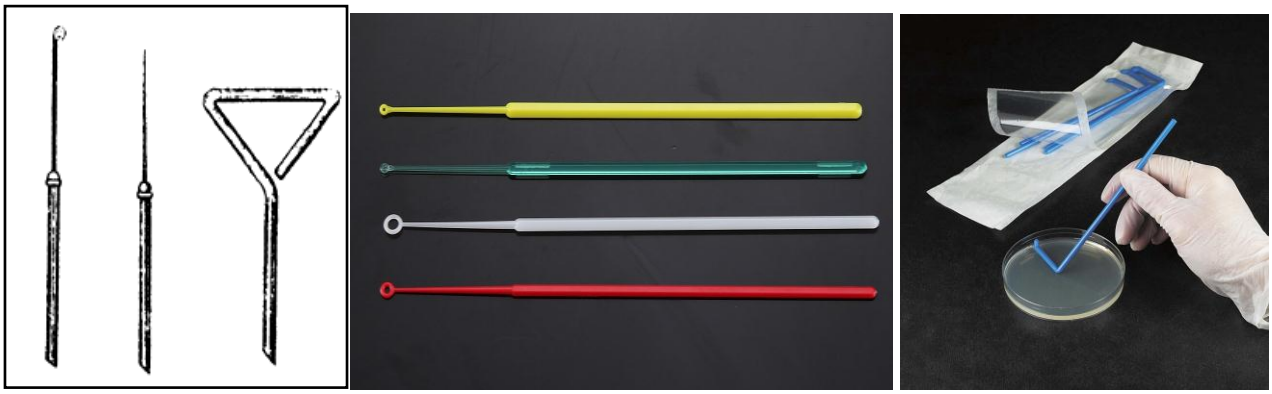


Рисунок 14 – Инстурменты для посева микроорганизмов

Важность этого метода объясняется тем, что во многих случаях врачи имеют дело с микробными ассоциациями, тогда необходимо устанавливать роль каждого из микробов в возникновении болезни.

Потому перед освоением основных принципов и методов выделения чистых культур необходимо овладеть техникой посевов и пересеваний бактерий в жидких и на плотные питательные среды.

Техника посевов микроорганизмов в жидкие и на плотные питательные среды имеет свои особенности, представленные в следующем разделе.

Контрольные вопросы:
1. Критерии классификации питательных сред?
2. При какой температуре плавятся и застывают агаровые среды?
3. Понятия – бактериальная культура и культивирование?
4. Приготовьте из сухих порошков среды Эндо, ЭМС, Плоскирева и разлейте их в чашки Петри.
5. Приготовьте скошенный агар.

1.12 Методы и способы культивирования микроорганизмов (аэробных и анаэробных бактерий). Техника посева бактерий в жидкие и плотные питательные среды

Цель занятия: Ознакомить обучающихся с техникой посевов бактерий на питательные среды, усвоить особенности культивирования анаэробов и аэробов

Задание:
1. Освоить технику посева бактерий в жидкие питательные среды.
2. Освоить технику посева бактерий на плотные питательные среды.
3. Освоить технику посева анаэробных бактерий на среду Китта-Тароци.
4. Усвоить способы культивирования бактерий.

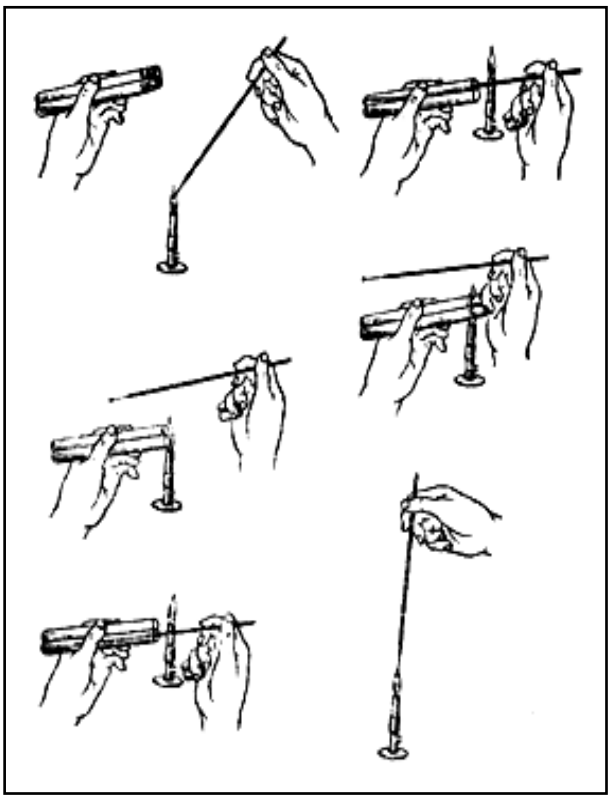
Материальное оснащение: готовые питательные среды – МПА, МПБ; скошенный МПА в пробирках, МПБ в колбах; флаконы с сухими средами; культуры стафилококков, сенной палочки; стерильные пробирки с МПБ и МПА, бактериологические петли, шпатели, стерильные чашки Петри и пипетки Пастера, эксикатор, термостат.

Техника посевов аэробных бактерии

Посев из пробирки в пробирку. Пробирку с культурой бактерий и пробирку со средой держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне, а их основания находились поверх кисти. Обычно пробирку с посевным материалом держат ближе к себе. В правой руке, как писчее перо, держат бактериальную петлю, и стерилизуют ее, держа вертикально в пламени горелки. Мизинцем и краем ладони правой руки вынимают обе пробки одновременно. Извлекают пробки не рывком, а плавно - легкими винтовыми движениями. Вынув пробки, края пробирок обжигают в пламени горелки. Прокаленную петлю вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом, охлаждают и, набрав немного материала, осторожно переносят в пробирку со средой (рис. 15).

При посеве в жидкую среду посевной материал растирают на стенке пробирки над жидкостью и смывают средой.

Затем осторожно вынимают, закрывают пробками пробирки, петлю обжигают на пламени горелки (пастеровскую пипетку опускают в банку с дезинфицирующим раствором - фенол, формалин). Во время работы следят, чтобы не намокли пробки.



При посеве на жидкие среды *тампоном*, его погружают в среду и 3-5 секунд ополаскивают в ней. При посеве на плотную среду материал втирают в ее поверхность, вращая тампон, после чего тампон обеззараживают.

Внимание! Следите, чтобы среда не вылилась и не смочила пробку.

При *посеве на скошенный агар* материал обычно растирают петлей на поверхности среды зигзагообразными движениями снизу вверх, начиная от границы конденсата.

При *посеве на плотные среды*, разлитые в пробирки столбиком, петлей с посевным материалом прокалывают столбик, производя так называемый посев "уколом".

Рисунок 15 – Техника посева в пробирках

После посева петлю извлекают из пробирки, края пробирок обжигают и, проведя пробки через пламя горелки, закрывают пробирки, после чего прокаливают петлю. Посев жидкого материала можно производить стерильными пипетками (пастеровскими или градуированными). После посева пипетки погружают в дезинфицирующую жидкость.

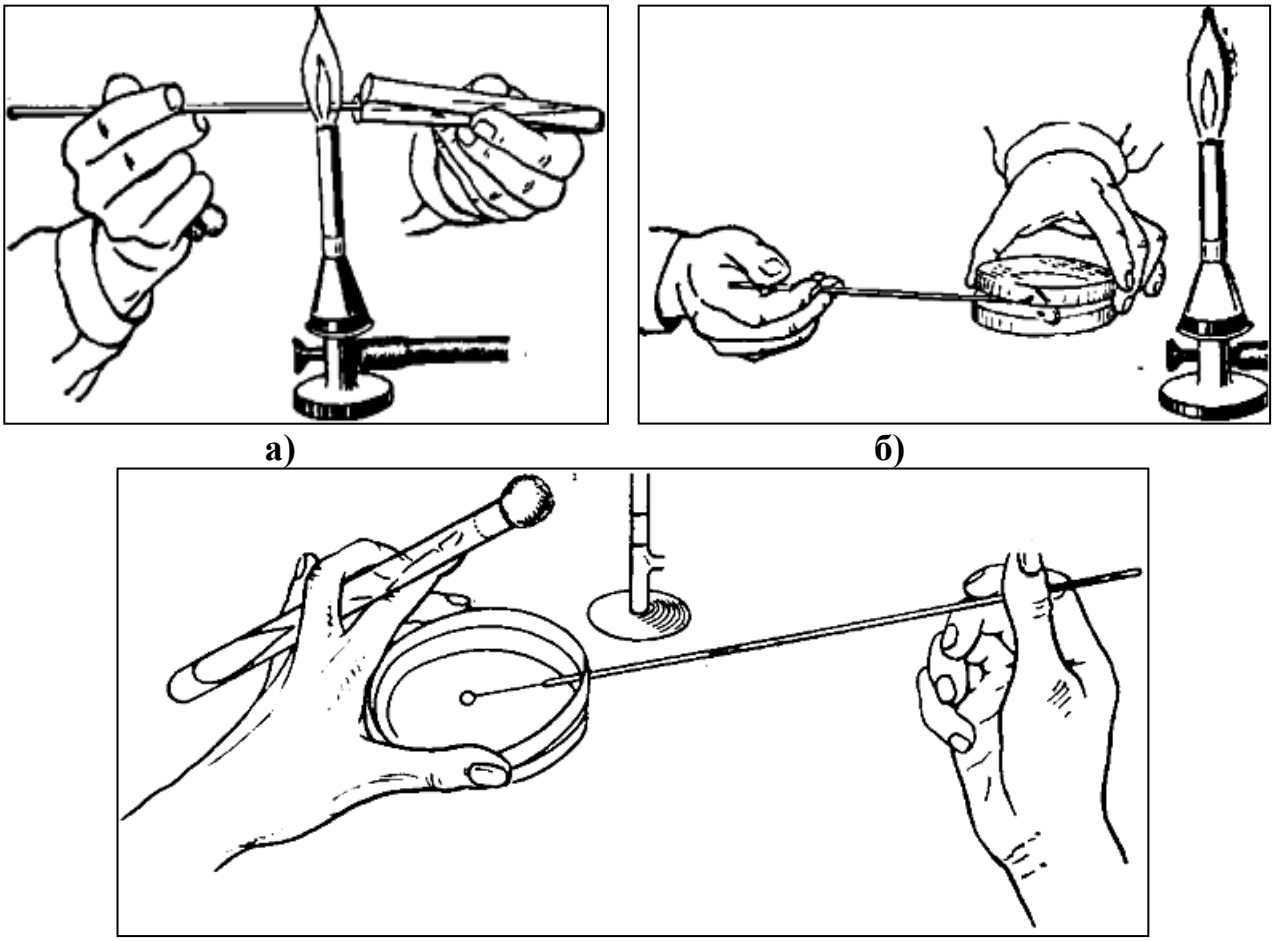
Пробирки закрывают, петлю прожигают. Пробирки с засеянной культурой надписывают и ставят в термостат для культивирования, через 16-18 или 24-48 часов учитывают результат.

Посев на пробирки с чашки Петри. Изучив характер роста культуры на чашке, со стороны дна отмечают восковым карандашом нужный для посева участок. Чашку с посевным материалом ставят перед собой крышкой вверх. Левой рукой приоткрывают крышку и вводят под нее обожженную петлю. Остудив петлю, набирают посевной, материал с отмеченного участка. Вынимают петлю, закрывают чашку и в левую руку берут пробирку со средой. Посев производят так же, как с пробирки в пробирку. После посева чашку поворачивают вверх дном (рис. 16, в).

Посев на агар в чашки Петри. Посев шпателем (рис. 16, б). *Шпатель* – это стеклянная или металлическая трубочка, конец которой загнут в виде треугольника. Шпатель можно сделать из пастеровской пипетки, согнув под углом ее тонкий конец, предварительно разогретый в пламени горелки.

Левой рукой слегка приоткрывают крышку, держа ее большим и указательным пальцем. Петлей, пипеткой или стеклянной палочкой наносят на поверхность среды посевной материал, после чего тщательно втирают его круговыми движениями шпателя до тех пор, пока шпатель не перестанет

свободно скользить по поверхности среды, левой рукой при этом придерживают крышку и одновременно вращают чашку. По окончании посева шпатель вынимают из чашки и закрывают крышку. Стеклянный шпатель помещают в дезинфицирующий раствор, а металлический прокаливают в пламени горелки.



а) **б)**

в)

Рисунок 16 – Техника посева бактерий на питательные среды:
а) в жидкую среду бактериологической петлей; б) шпателем на агар;
в) бактериологической петлей из бульона на плотную агаризованную среду

Посев тампоном. Тампон с посевным материалом вносят в слегка приоткрытую чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, вращая при этом тампон и чашку.

Посев газоном. Примерно 1 мл (20 капель) жидкой культуры (если культура с плотной среды, ее эмульгируют в стерильном изотоническом растворе или бульоне) наносят на поверхность агара и тщательно распределяют жидкость по поверхности среды. Чашку слегка наклоняют и пипеткой отсасывают избыток культуры, выливая ее в дезинфицирующий раствор. Туда же помещают пипетку.

Посев в толщу агара. Культуру, выращенную на жидкой среде, или эмульгированный материал вносят в сосуд с расплавленным и остуженным до 45° С агаром, перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри. Можно

внести посевной материал в пустую чашку и залить 15-20 мл остуженного до 45° С агара. Для перемешивания содержимого чашки ее слегка покачивают и вращают. Чашки оставляют на столе до застывания среды.

Засеянные чашки подписывают со стороны дна и помещают в термостат дном вверх.

Для посева бактерий на поверхность плотной среды (МПА, скошенный агар и т.д.) используют метод ***штрихов*** при помощи бактериологической петли (рисунок 17).

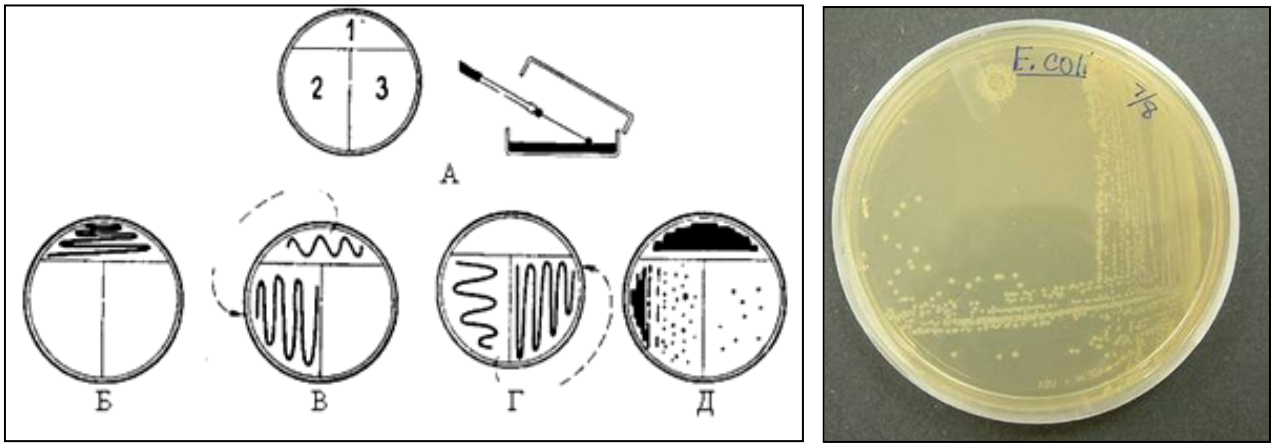


Рисунок 17 – Техника посева бактерий методом штрихов

Посев петлей. Небольшое количество посевного материала (иногда его предварительно эмульгируют в стерильном изотоническом растворе или бульоне) втирают петлей в поверхность среды у края чашки, несколько раз проводя петлей из стороны в сторону. Затем у того места, где закончились штрихи, агар прокалывают петлей, снимая избыток посевного материала. Оставшийся на петле посевной материал зигзагообразными движениями распределяют по всей поверхности среды. По окончании посева закрывают чашку и прожигают петлю.

Посев петлей на секторы. Чашку со стороны дна расчерчивают на секторы. Посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру. Необходимо следить, чтобы штрихи не заходили на соседний сектор.

Методы культивирования аэробов

Для успешного культивирования аэробных бактерий необходимы следущие условия:

- правильно подбирать среды и правильно производить посев;
- создать оптимальные условия: температура, влажность, аэрация (снабжение воздухом).

Температура. Для выращивания микробов в лабораторных условиях используют специальный аппарат - ***термостат,*** в котором поддерживается постоянная и оптимальная температура (37^0С) для культивирования большинства патогенных микроорганизмов (рис. 18). Это прибор с двойными стенками, между которыми находится воздух или вода, подогреваемые электричеством. Он снабжен терморегулятором, поддерживающим нужную

температуру, и термометром для контроля за температурой.

Рисунок 18 – Термостат, для культивирования микроорганизмов

Пробирки с посевами в штативах, проволочных сетках или банках устанавливают на полках термостата. Чашки Петри с культурами в термостате должны стоять вверх дном.

Для свободной циркуляции воздуха в термостате и равномерного нагрева, полки в термостате делают с прорезями и плотно не загружают. Чтобы не охладить культуры, термостат не оставляют надолго открытым.

Свет - большинству микробов (к ним относятся все патогенные) не нужен - их культивируют в темноте. Однако для изучения пигментообразования, которое происходит активнее на рассеянном свету, культуры после термостата выдерживают 2-3 дня при комнатном освещении.

Следует избегать попадания прямых солнечных лучей, действующих на культуры губительно.

Влажность. Жизнь микробов невозможна без влаги - питательные вещества проникают в клетку только в растворенном виде. Это необходимо учитывать при культивировании на плотных средах: разливать их в чашки и скашивать в пробирках лучше в день посева. При культивировании микробов, особенно чувствительных к отсутствию влаги, например гонококков, в термостат ставят открытый сосуд с водой.

Аэрация. По потребности микробов в свободном кислороде их делят на аэробы и анаэробы. Обе группы требуют различных условий культивирования.

Поступление кислорода, необходимого для культивирования аэробов и факультативных анаэробов, осуществляется при пассивной и активной аэрации.

Пассивная аэрация - это культивирование на плотных и жидких средах в сосудах, закрытых ватными или ватно-марлевыми пробками, или в чашках Петри. При таком культивировании микробы потребляют кислород, растворенный в среде, находящийся в сосуде над средой и поступающий через пробку. Пассивно аэрируемые культуры можно выращивать на поверхности или в тонком слое среды, куда проникает кислород воздуха.

Активную аэрацию применяют при глубинном культивировании

микробов, когда их выращивают в больших объемах среды. Чтобы достаточно снабдить кислородом такие культуры, их помещают в специальные качалки - постоянное перемешивание культуры обеспечивает соприкосновение ее с воздухом. При культивировании в объемах жидкости, достигающих десятков и сотен литров, проводимом в приборах, называемых реакторами или ферментерами, воздух продувают через культуру при помощи специальных устройств.

Сроки культивирования. Большинство бактерий культивируют 18-24 часа, но есть виды, растущие медленно (до 4-6 недель). Чтобы сохранить в них влагу, ватные пробки после посева заменяют стерильными резиновыми или надевают на них резиновые колпачки.

Методы и способы культивирования анаэробов

Более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должен быть сведен до минимума контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом. Для этого используют различные способы для создания анаэробных условий.

Их подразделяют на *физические, химические и биологические.* Все они основаны на том, что микроорганизмы культивируют в каком-то замкнутом пространстве.

К физическим методам создания анаэробных условий относится выращивание микроорганизмов в микроанаэростатах – вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Анаэростатом может служить обычный стеклянный эксикатор с притертой крышкой. Из анаэростата откачивают воздух, а затем заполняют его газовой смесью, состоящей на 80-90% из азота и на 10–20% углекислого газа, до давления порядка 500 мм рт. ст.

К химическим способам создания анаэробных условий относится *использование химических веществ, поглощающих кислород*. В качестве поглотителей кислорода в лабораторной практике применяется щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реагенты. Поглотители помещают на дно химического эксикатора, в который помещают анаэробные микроорганизмы, засеянные в пробирки, колбы или чашки Петри. Эксикатор закрывают притертой крышкой. При этом способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность используемых веществ и объем замкнутого пространства, в котором выращивается культура.

Биологический способ создания анаэробных условий заключается в следующем. Питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают облигатные аэробные бактерии, а на другую облигатные анаэробные бактерии. Чашку закрывают, зазор между донышком и крышкой заливают парафином или воском и помещают в термостат с оптимальной для роста микроорганизмов температурой. Вначале наблюдается рост аэробных микроорганизмов (до истощения свободного кислорода), после чего начинается размножение клеток анаэробов.

Для культивирования анаэробных бактерий используют **и другие методы,** ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре:

• выращивание в высоком слое среды;

• выращивание в толще плотной среды;
• культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости;
• заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Посевы для культивирования анаэробов

Техника посевов для культивирования анаэробов такая же, как и для анаэробов, но, важно создать для них условия *анаэробиоза*, для этого применяют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (среда Китта-Тароцци) - на дне пробирки помещены кусочки вареной печени, сверху среда залита слоем вазелинового масла (1-2 см). Перед посевом эту среду нужно *регенерировать* – для этого пробирки со средой кипятят на водяной бане, затем быстро охлаждают под струей холодной (водопроводной) воды. При кипячении кислород воздуха из среды, удаляется, а вазелиновое масло ограждает от проникновения воздуха из вне. Кусочки печени обеспечивают анаэробов связанным (атомарным) кислородом за счет «*биосистемы*» печеночных клеток.

Анаэробы можно также культивировать в полужидком МПА с высоким столбиком. Для этого посев производят вглубь среды или анаэробиоз создают следующим образом: исследуемый материал засевают, например, на специальную расплавленную среду Вильсон-Блера, после вносят исследуемый материал, хорошо перемешивают вращением колбы (пробирки) между двумя ладонями, затем содержимое осторожно выливают в стерильную чашку Петри и дают застыть ровным слоем. Когда среда остынет, на ее поверхности ровным слоем наливают расплавленный МПА. После остывания (уплотнения среды) чашки помешивают в термостат.

Культивирование актиномицетов, грибов, микоплазм, L-форм, спирохет и простейших. Культивирование этих микроорганизмов принципиально сходно с культивированием бактерий. Для них разработаны специальные среды и подобраны режимы, соответствующие их потребностям.

Культивирование риккетсий. Риккетсии являются облигатными паразитами, т. е. могут развиваться только в живых клетках. Их культивируют в культурах тканей, организме экспериментальных животных, развивающихся куриных эмбрионах.

Контрольные вопросы:

1. Что следует понимать под названием «культивирование» бактерий?
2. Основные условия и методы культивирования.
3. Основные методы создания анаэробиоза.
4. На чем основан принцип использования среды Китта-Тароцци при культивировании анаэробов?
5. Особенности культивирования риккетсий.

1.13 Методы выделения чистой культуры бактерий

Цель занятия. Усвоить диагностическое значение выделения чистой культуры и освоить методы, применяемые для получения чистой культуры микроорганизмов

Задание:

1. Выделить чистую культуру бактерий по методу Коха.
2. Выделить чистую культуру стафилококка методом Дригальского.
3. Выделить чистую культуру анаэробов.
4. Выделить чистую культуру бактерий химическим методом.

Материальное оснащение: стерильные пробирки с физраствором по 10 мл, стерильный МПА в пробирках (столиком по 9 мл), чашки Петри с агаром, градуированные пипетки, пастеровские пипетки, пробирки со взвесями бактерий - стафилококков, сальмонеллы.

Микробы, выделенные из внешней среды, организма животных или людей и размноженные на питательных средах, называют ***культурами.***

В исследуемом материале во многих случаях находится смесь двух или нескольких видов бактерий. Выделение из смеси одного вида микроорганизмов (например, возбудителя конкретной болезни) называют выделением чистой культуры. Это является основной задачей при проведении бактериологической диагностики.

Чистая культура – это кульутура, состоящая из микроорганизмов только одного вида, который определяется по совокупности его свойств.

С этой целью специальными методами посевов достигается рост бактерий отдельными колониями (на плотных питательных средах).

Колония – это видимые невооруженным глазом скопления бактерий на поверхности или в толще плотной питательной среды. Каждая колония формируется из потомков одной микробной клетки (клоны), потому их состав всегда однороден.

Культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника (организм животного, воздух, почва и др.) получила название ***штамм.***

Если выделенная бактериальная культура одного вида различается по некоторым признакам, то она называется – ***вариант.***

Чистые культуры бактерий позволяют установить бактериологический диагноз. Они нужны при диагностике инфекционных болезней, для определения видовой и типовой принадлежности микробов, в исследовательской работе, для получения продуктов жизнедеятельности микробов (токсинов, антибиотиков, вакцин и т. п.).

Методы выделения чистой культуры микроорганизмов из исследуемого материала можно отнести к двум группам – ***механические и биологические.***

Механический принцип выделения чистой культуры бактерий

1. Метод последовательных разведений, предложен Л. Пастером, был одним из самых первых, который применялся для механического разъединения микроорганизмов. Он заключается в последовательном разведении материала,

содержащего бактерии, в стерильной жидкой питательной среде. Для этого берут ряд пробирок со стерильным МПБ (по 9-10 мл), исследуемый материал пипеткой вносят в первую пробирку, перемешивают, затем из нее небольшое количество (0,1 мл) переносят во вторую после перемешивания в третью и т.д. (до 10 пробирок).

Этот прием достаточно кропотлив и несовершенный в работе, поскольку не позволяет контролировать количество микробных клеток, которые попадают в пробирки при разведениях.

Л. Пастер предполагал, что в последней пробирке возможен рост одного вида микроба, что было маловероятно, и в настоящее время метод серийных разведений Пастера используют только как подсобный при других методах.

***2. Метод Коха (метод пластинчатых разведений*).** Р.Кох использовал плотные питательные среды на основе желатины или агар-агара. *Суть метода* Коха заключается в том, что, используя метод Пастера, исследуемый материал (с ассоциацией разных видов бактерий) разводят в 4-5 пробирках с расплавленным и остуженным до 45-50^0 МПА по 10-15 мл, затем осторожно содержимое пробирки выливают в стерильную чашку Петри и распределяют среду тонким слоем. Чашку закрывают и, когда агар застынет, перевертывают вверх дном, помещают в термостат на 18-24 или 48 часов. После на поверхности МПА вырастают колонии бактерий, но там, где концентрация микробов была меньше, вырастают изолированные друг от друга колонии. С обратной стороны (по дну чашки) карандашом по стеклу отмечают нужную колонию. Затем, приоткрыв крышку чашки, бактериологической петлей снимают одну (отмеченную) колонию, не касаясь других, и переносят в пробирки со стерильным МПБ и МПА, последние помещают в термостат. Получают рост чистой культуры (рис. 19).

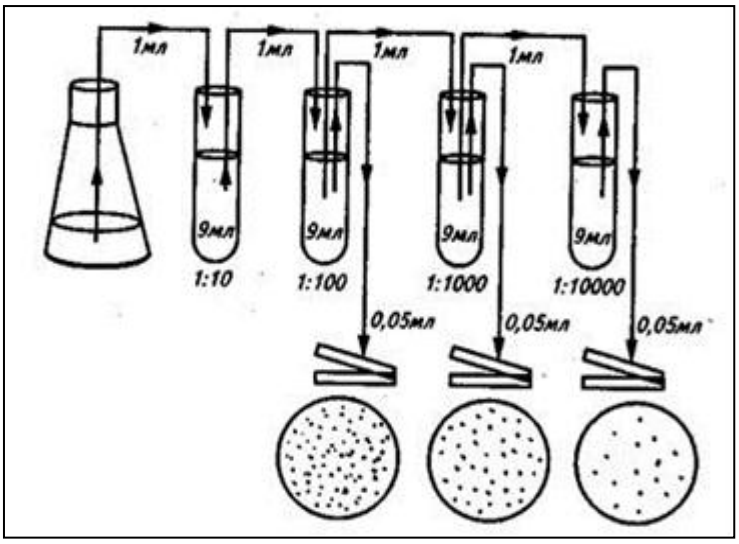


Рисунок 19 – Метод Коха

3. Метод Дригальского (метод пластичного посева) - является более совершенным методом, который широко распространен в повседневной микробиологической практике (рис. 20).

Для этого готовят 4-5 стерильных чашек Петри с плотной агаризированной средой. Каплю исследуемого материала бактериальной петлей наносят на поверхность агара, затем с помощью шпателя Дригальского тщательным образом втирают в среду. Чашку во время посева держат преоткрытой и осторожно вращают, чтобы равномерно распределить материал. Этим же штапелем, не стерилизуя его, растирают по поверхности среды второй чашки,

затем последовательно в третьей. Только после этого шпатель окунают в дезинфицирующий раствор или прожаривают в пламени горелки.

На поверхности среды в первой чашке, как правило, наблюдается сплошной рост бактерий, во второй – густой рост, а в третьей – рост в виде изолированных колоний (рис. 21).

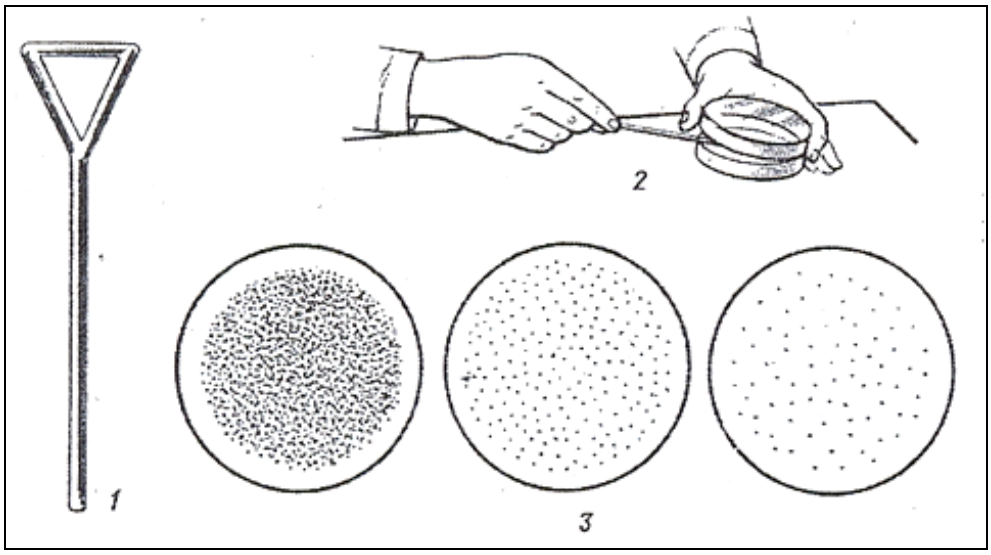


Рисунок 20 – Метод Дригальского

Далее, нужную колонию отмечают, отвивают в МПБ и МПА, помещают в термостат для культивирования и дальнейшей идентификации.

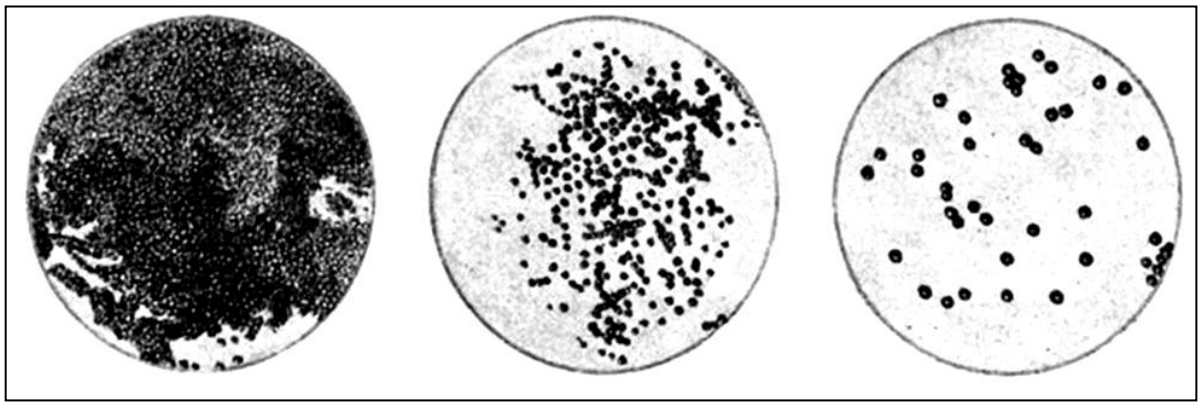


Рисунок 21 – Колонии по методу Дригальского

4. Метод штриховых посевов чаще всего сегодня используется в микробиологических лабораториях. Материал, который содержит смесь микроорганизмов, набирают бактериологической петлей и наносят на поверхность питательной среды возле края чашки. Снимают избыток материала и проводят его параллельными штрихами от края к краю чашки. Спустя сутки инкубации посевов при оптимальной температуре на поверхности чашки вырастают изолированные колонии микробов (рис. 22).

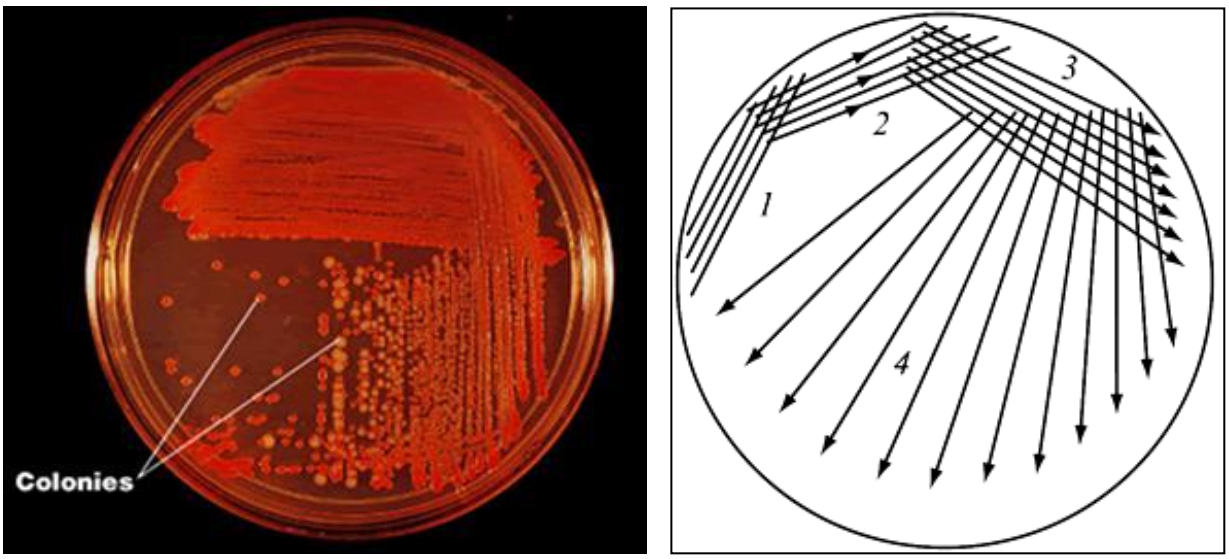


Рисунок 22 - Метод штрихов

Методы выделения чистых культур, основанные на биологическом принципе

Они основаны на учете тех или иных биологических особенностей выделяемых бактерий в чистую культуру.

Среди самых распространенных методов можно выделить следующие:

1. Выделение спорообразующих микроорганизмов

При выделении чистых культур из исследуемого материала, содержащего споровые формы микробов, его прогревают 10 мин при 80° или 2-3 мин при 100° в расчете на то, что менее стойкие неспоровые формы погибнут при этой температуре. При этом споровые формы останутся жизнеспособными.

Из прогретого материала проводится посев на питательные среды, на которых вырастают спорообразующие микроорганизмы.

В случаях необходимости отделения споровых форм бактерий от неспорообразующих видов готовят взвесь исследуемого материала, прогревают ее в водяной бане при 80^0С 30-40 минут, вегетативные формы микроорганизмов погибают, споры сохраняются жизнеспособными. Далее поступают так, как это описано выше: прогретую взвесь высевают по методу Дригальского или Коха.

2. Выделение кислоустойчивых микроорганизмов.

Для выделения чистой культуры возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза из патологического материала используют химический метод. С этой целью исследуемый материал после его гомогенизации обрабатывают 6%-ным раствором серной кислоты в течение 5-7 мин, добавляя ее в равном объеме. Благодаря этому погибают микробы сопутствующей микрофлоры, а кислотоустойчивые остаются жизнеспособными.

После нейтрализации раствора кислоты проводят посев на специальные питательные среды, на которых вырастают кислотоустойчивые микробы.

3. Выделение подвижных микроорганизмов (метод Шукевича)

Исследуемый материал, из которого выделяется подвижный микроб, засевают в конденсационную воду скошенного МПА. При посеве необходимо

следить, чтобы петля с материалом не коснулась поверхности среды над конденсационной водой. Бактерии, обладающие активной подвижностью, вырастут не только в конденсационной воде, но и вне ее, на поверхности МПА. Из верхней части роста производят повторно посев в конденсат свежей питательной среды. Производя таким образом несколько пересевов, в конце концов получают чистую культуру подвижных бактерий.

4. Выделение патогенных микроорганизмов

Чистые культуры патогенных бактерий выделяют путем заражения исследуемым материалом лабораторных животных, наиболее восприимчивых к тому или иному возбудителю (биологический метод).

После гибели животного из крови и органов трупа делают посевы на питательные среды, на которых в большинстве случаев вырастает чистая культура возбудителя (этот метод подробно представлен в разделе «Заражение лабораторных животных»).

Получение чистой культуры анаэробов

Принцип сохраняется тот же, что при работе с аэробами, только используют специальные среды: применяя метод Дригальского, посев проводят на глюкозно-кровяном агаре в чашках Петри, которые затем помещают в условия анаэробиоза (прибор анаэростат). Пользуются также методом посева на среду Вильсона-Блера, когда вырастают отдельные черные колонии, их пересевают в среду Китта -Тароцци, получая, таким образом чистую культуру. Этой же цели могут служить биологическая проба: исследуемым материалом заражают восприимчивое животное. После его гибели посевы в среды Китта-Тароцци, полужидкий агар, как упомянуто выше. Есть и другие способы, они изложены при описании отдельных видов анаэробов.

Таким образом, выделение чистых культур возбудителей имеет несколько способов, а также последовательность действий (этапы).

Этапы выделения чистых культур аэробных бактерий:

1 этап исследования - в стерильную посуду (пробирка, колба, флакон) забирают патологический материал.

Проводят посев бактериологической петлей, шпателем по методу Дригальского на плотные питательные среды. Чашки переворачивают вверх дном, подписывают специальным карандашом и ставят в термостат при оптимальной температуре (37°С) на 18-48ч.

Цель этапа – получить изолированные колонии микроорганизмов.

2 этап исследования - на второй день изучают изолированные колонии, которые выросли на поверхности агара. Нужную колонию выделяют карандашом с обратной стороны чашки Петри, и делают пересев на скошенный агар для получения чистой культуры.Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства возбудителей.

3 этап исследования - на третий день изучают характер роста чистой культуры микроорганизмов и проводят ее идентификацию (изучают биохимические, культуральные и антигенные свойства бактерий);

4) Вывод о выделенной культуре.

Порядок идентификации бактерий:

I – Выявление основных видовых признаков бактерий:

1. Морфология микробной клетки;
2. Тинкториальные свойства;
3. Культуральные свойства – особенности роста бактерий на средах;
4. Биохимические свойства – наличие свойственных бактериям ферментов.

II – Определение дополнительных признаков при идентификации бактерий:

1. Наличие видоспецифических антигенов;
2. Видовая чувствительность к бактериофагам;
3. Видовая резистентность к определенному антибиотику;
4. Для патогенных бактерий – продуцирование определенного вирулентного фактора (токсина, фермента и т.д.).

В последние годы широко используют современные биохимические методы ***молекулярно-биологической идентификации*** микроорганизмов: хемоидентификация, анализ нуклеиновых кислот, рестрикционный анализ, гибридизация, полимеразная цепая реакция (ПЦР), риботипизация и т.д.

Контрольные вопросы:

1. На чем основан принцип получения чистой культуры бактерий по методу Коха, Дригальского.
2. В чем суть биологического метода выделения чистой культуры.
3. Принципы химического метода получения чистой культуры.
4. Методы получения чистой культуры анаэробов.
5. Основные видовые признаки бактерий?

Вопросы для самоподготовки и контроля знаний.

1) Найдите каждому определению соответствующий термин:

1. Популяция микробов, состоящая из особей одного вида.
2. Культура микроорганизмов, полученная из одной особи (одноклеточная культура).
3. Культура микробов одного вида, выделенная из определенного источника (организм животного, окружающая среда).
4. Культура микроорганизмов одного вида, различающаяся по некоторым признакам (в пределах характеристики вида):

А) Клон. В) Вариант.
Б) Штамм. Г) Чистая культура.

2. В ветеринарную лабораторию поступил исследуемый материал после убоя животного с подозрением на туберкулез. Какой обработке необходимо подвергнуть материал перед посевом для выделения возбудителей туберкулеза?

А) Прогреть при 80° 2-3 мин.
Б) Обработать 6%-ным раствором серной кислоты в соотношении 1:6.
В) Засеять без обработки.

3. В ветеринарную лабораторию поступил несвежий патологический материал (кусочки мышц) после гибели коровы с подозрением на эмфизематозный карбункул. Какой обработке необходимо подвергнуть материал перед посевом для выделения возбудителя?

А) Прогреть при 80° 15-20 мин.
Б) Обработать 6%-ным раствором серной кислоты в соотношении 1:6.
В) Засеять без обработки.

4. В ветеринарную лабораторию на экспертизу поступили пробы мяса после вынужденного убоя животного. Необходимо исключить присутствие в них вульгарного протея, который может вызвать массовые отравления людей. Какой метод используете для выделения чистой культуры этого микроба?
А) Рассев на МПА в чашках Петри.
Б) Прогрев материала с последующим посевом на МПА.
В) Посев на МПБ.
Г) Посев на скошенный МПА в конденсат.

5. В ветеринарную лабораторию поступил исследуемый материал (ухо) от павшей нетели с подозрением на сибирскую язву. Какой метод используете для выделения чистой культуры возбудителя?
А) Посев на МПА и МПБ.
Б) Посев на среду Эндо.
В) Заражение лабораторного животного.
Г) Посев на скошенный агар в конденсат.

1.14 Культуральные свойства микроорганизмов

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с основными культуральными свойствами микроорганизмов - характером роста в жидких и на плотных питательных средах. Усвоить значимость определения культуральных свойств, при бактериологической диагностике (при идентификации баткерий).

Задание:

1. Опишите культуральные свойства сенной палочки в МПБ.
2. Опишите культуральные свойства сенной палочки на МПА.
3. Изучить культуральные свойства сибиреязвенной бациллы (вакцинный штамм) в МПЖ.

Материальное оснащение: посевы, сделанные на предыдущем занятии, Культуры (для демонстрации): B.mucoides, сенная палочка (B.Subtilis) на МПА и сенная палочка на МПБ, сибиреязвенная бацилла (вакцинный штамм) в МПЖ. Стерильные питательные среды в пробирках (МПА, МПБ), скошенный МПА. Лупы, бактериологические петли, спиртовки, предметные стекла, набор красок для окрашивания по Граму. Микроскопы.

Учитывая результаты посевов прошлого занятия – под руководством преподавателя описать рост бактерий на плотной и жидкой среде.

Культуральными свойствами бактерий называют характер их роста на плотных и жидких питательных средах.

Изучение культуральных свойств бактерий (наряду с другими свойствами) необходимо при проведении бактериологической диагностики с целью идентификации выделенных бактерий из исследуемого материала.

Чистую культуру бактерий идентифицируют – определяют вид или тип (вариант) микроорганизма, морфологические, культуральные, биохимические (ферментативные), серологические (антигенные) и патогенные свойства.

Рост бактерий в жидких питатательных средах

Рост микрорганизмов в жидких питательных средах характеризуется *не большим разнообразием.*

Рост бактерий в жидких питательных средах характеризуется следующими признаками:

При макроскопическом исследовании (невооруженным глазом) отмечают ***характер и степень помутнения среды:***

- равномерное (диффузное),
- интенсивное,
- умеренное, слабое и в виде опалесценции.

Не встряхивая содержимое пробирки с посевом, вначале обращают внимание на ***поверхностный рост,*** который может быть в виде:

- пристеночного кольца, или
- пленки по всей поверхности среды,
- подниматься (зигзагообразно) на стенки пробирки,
- покрывать только часть поверхности среды, не доходя до стенки сосуда.

По своему характеру ***пленка*** может быть:

по толщине – тонкая, толстая, нежная или грубая;

по характеру поверхности – складчатая, морщинистая, гладкая, сетчатая, пушистая или ровная;

по консистенции – хрупкая, слизистая, сальная.

по цвету, оттенку - голубоватая, желтая, серая, белая.

Многие бактерии на жидких питательных средах образуют на дне пробирки ***осадок,*** который выявляется при легком встряхивании пробирки. Он может быть:

- обильный и незначительный;
- плотный (компактный), рыхлый, зернистый, в виде комочков ваты, хлопьевидный, крошковидный, слизистый.
- *по цвету* - белый, желтоватый, матовый, зеленоватый, сероватый и др.

При встряхивании осадок либо разбивается, создавая равномерное помутнение среды, либо образуются крупные или мелкие хлопья, глыбки; слизистый осадок может подниматься вверх в виде «косички» с помутнением среды, или она при этом остается прозрачной.

Ряд бактерий образует ***водорастворимые пигменты***, которые равномерно окрашивают питательную среду в сине-зеленый, ярко-красный и желтый цвета.

Рост культуры в жидкой среде может быть ***пристеночным.*** Он сопровождается прикреплением и размножением микробов на стекле (на стенках пробирок) с образованием характерного матового налета, мелких хлопьев, зерен.

Культуры бактерий некоторых видов могут обладать одновременно не одним, а несколькими признаками проявления роста в жидкой среде,

например, вызывать помутнение среды с образованием осадка, пристеночного кольца и др. (рис. 23).

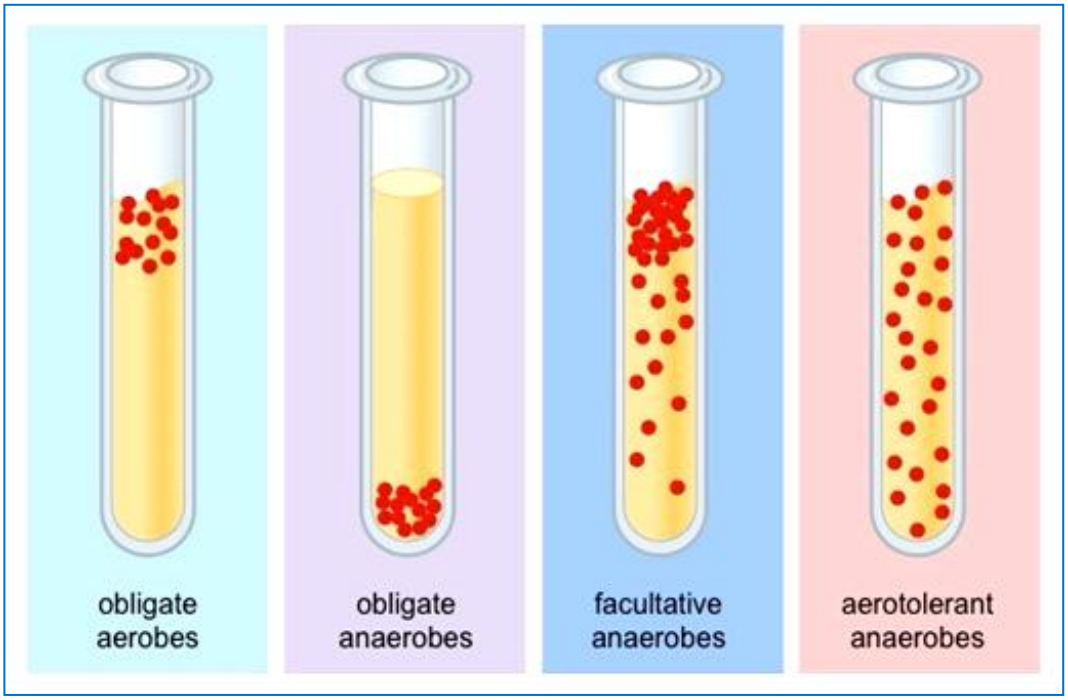


Рисунок 23 – Особенности роста бактерий в жидких питательных средах

Рост микроорганизмов на плотной среде

На плотных средах (МПА, кровяной агар и т.д.) бактерии растут в виде колоний, которые подвергают изучению (рис. 24).

Колонии - скопление микроорганизмов, образующихся в результате размножения одной бактериальной клетки.

Макроскопическое изучение колоний в проходящем свете проводится невооруженным глазом, либо под микроскопом (объектив х8) или при помощи лупы. Чашку поворачивают дном к себе на расстоянии лучшей видимости. При наличии двух различных видов колоний их нумеруют и описывают каждую в отдельности. Учитывают следующие **признаки:**

1) Рост колоний характеризуется большим разнообразием, они могут быть ***изолированными и слившимися.***

2) отмечают ***характер роста*** - обильный, умеренный, скудный, затем однотипность форм колоний (или разнотипность);

3) ***величина колоний*** (крупная – 4-5 мм в диаметре и более, средняя – 2-4 мм, мелкая – 1-2 мм, карликовая – не более 1 мм);

4) ***форма колоний*** - правильная (округлая, овальная) и неправильная (розеткообразная, ризоидная и др.);

5) ***степень прозрачности и блеск*** (просматривают в проходящем свете) – плотная - непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная, мутная, густая, блестящая, флуоресцирующая колония;

6) ***края колонии*** - ровные *(S-форма),* шероховатые *(R- форма),* волнистые, бахромчатые, зубчатые, локонообразные, изрезанные;

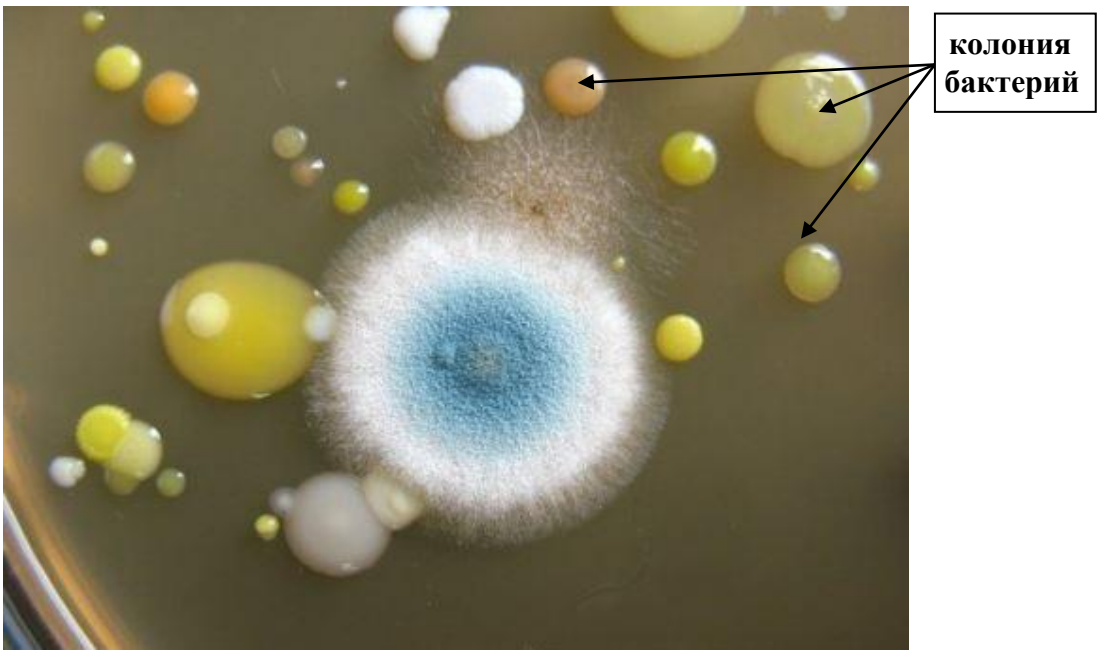


Рисунок 24 – Виды колоний бактерий на плотной среде

7) ***цвет колонии*** (рассматривают в отраженном свете со стороны крышки, не открывая ее) - серовато-белый, бесцветный, кремовый, оранжевый, зеленый, голубоватый, золотистый, лимонно-желтый, красный, синий, черный и др.

Цвет колоний культуры бактерий зависит от цвета вырабатываемого ими пигмента. Кроме цвета (окраски) колоний, отмечают также способность микроорганизмов выделять *пигмент* в толщину среды *(растворимый)* или на поверхность, окрашивая только колонию, а не среду (*нерастворимый* пигмент);

8) ***профиль (рельеф) колоний*** - кратерообразный, выпуклый, плоский, конусовидный, с валиком по окружности;

9) ***поверхность*** - гладкая, бугристая, морщинистая, складчатая, бороздчатая, с концентрическими кругами;

10) ***консистенция*** (определяют прикосновением к поверхности колонии бактериологической петлей) - плотная (легко снимается с агара или врастает в толщу среды), крошковатая, хрупкая, слизистая, тягучая (прилипает к петле), тестообразная, маслянистая;

11) ***структура*** - однородная, волокнистая, пленчатая, зернистая;

12) ***положение колонии на питательной среде*** - возвышающаяся над средой, погруженная в среду, на уровне среды – плоская, плотно прилегающая к среде – уплощенная.

Таким образом, при изучении культуральных свойств бактерий в жидких средах учитывают вышеуказанные признаки (рис. 25), а результат вносят в протокол исследования.

При просмотре колоний под микроскопом в чашке Петри помещают на предметный столик дном вверх, а пробирки с агаровой культурой - скошенной поверхностью агара вниз.

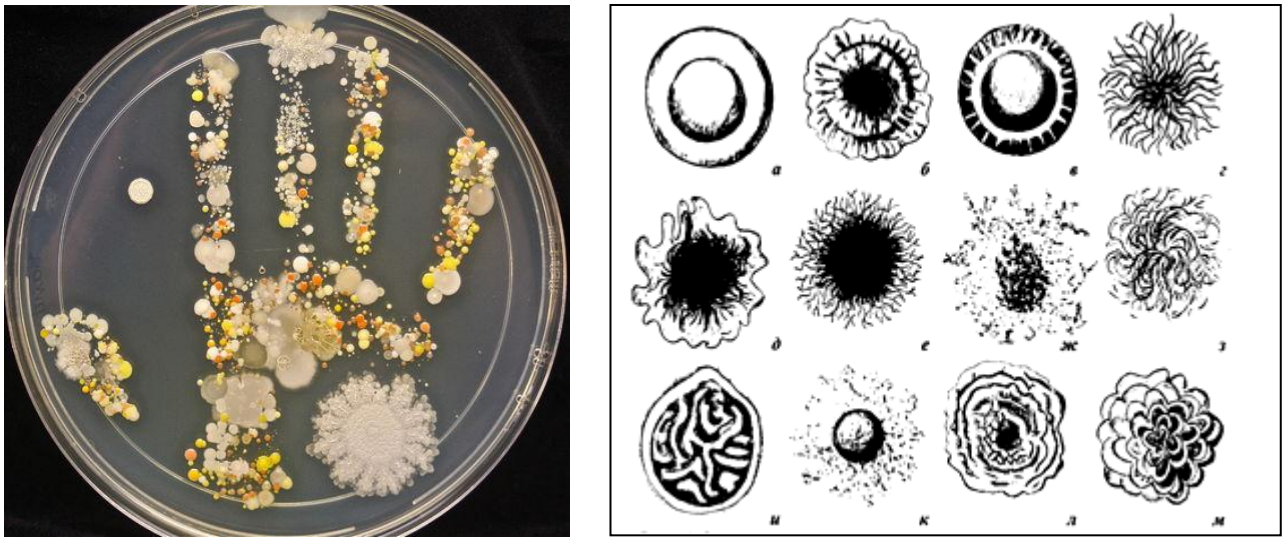


Рисунок 25 – Виды колоний бактерий

Вопросы для самоподготовки и контроля знаний

1. Что входит в понятие «культуральные свойства бактерий»?
2. Какие признаки принимают во внимание при характеристике роста бактерий на плотных и жидких питательных средах?
3. Дайте определение «колония бактерий».
4. Принцип идентификации микроорганизмов.

1.16 Ферментативные (биохимические) свойства микрооганизмов

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с видами ферментативной активности бактерий. Освоить лабораторные методы определения биохимических свойств микроорганизмов.

Задание:

1. Для определения сахаролитических свойств провести посевы микробных культур на среды с углеводами (полужидкие МПА с глюкозой, лактозой, сахарозой, на агар Эндо).

2. Для определения протеолитических свойств провести посев в МПЖ, в пробирки с МПБ закрепить пробками индикаторные бумажки для определния индола, сероводорода, аммиака.

3. Для определения редуцирующих свойств микробов их культуры засеять в среды с метиленовым синим и лакмусом.

Материальное оснащение: пробирки с посевами от предыдущего занятия, пробирки с чистыми культурами золотистого стафилококка, сальмонелл, эшерехий, стерильные пастеровские пипетки, спирт, 5% раствор перекиси водорода, стерильный пинцет, стерильные питательные среды: полужидкий МПА с глюкозой, лактозой, сахарозой и индикаторм ВР (или пробирки с жидкими средами Гисса - с индикатором Андредэ, с углеводами и поплавками), молоко с метиленовым синим, молоко с лакмусом, МПБ, МПЖ по одной

пробирке, агар Эндо (или Левина) и кровяной агар, индикаторные бумажки для определения сероводорода, индола, аммиака.

Ферментативная (биохимическая) активность микроорганизмов богата и разнообразна, обусловлена она наличием у бактерий специфических ферментов, а также условиями окружающей среды.

Ферменты играют большую роль в жизнедеятельности микроорганизмов - они участвуют в различных биохимических реакциях, лежащих в основе питания, роста, и размножения микроорганизмов.

Разные виды микрооганизмов имеют различный набор ферментов. При оптимальных условиях бактерии продуцируют постоянные ферменты ***(конститутивные ферменты)*** или группу ферментов в зависимости от вида субстрата ***(индуцибельные ферменты)***.

Отдельные виды микроорганизмов обладают способностью расщеплять только белки и углеводы с образованием конечных и побочных продуктов распада, а некоторые - окислять или восстанавливать различные субстраты. Это обстоятельство послужило основой включения ферментативных свойств бактерий в группу признаков для *их идентификации.*

Рассмотрим основные ферментативные свойства бактерий и методы их качественного определения.

К **биохимическим (ферментативным) свойствам бактерий** относятся:

1. Сахаролитические свойства.
2. Протеолитические свойства.
3. Гемолитические свойства.
4. Редуцирующие /восстанавливающие свойства.
5. Каталазная активность, наличие ферментов оксидазы, плазмокоагулазы и др.

В лабораторной микробиологической практике изучение биохимических свойств бактерий является одним из важнейших дифференциально-диагностических методов точного распознания возбудителя инфекционной болезни. По ферментативной активности можно установить не только видовую и типовую принадлежность микроба, но и определить его варианты (так называемые биовары).

Идентификация/соответствие – это изучение определенного комплекса фенотипических признаков изучаемого микроорганизма. Определение видового состава микроорганизмов.

Методы определения ферментативных (биохимических) свойств

1. Сахаролитические свойства (сахаролитическая активность бактерий) - определение ферментации углеводов.

Это способность расщеплять сахара (углеводы) и многоатомные спирты с образованием кислоты или кислоты и газа.

Для такого определения чистую культуру бактерий засевают на *дифференциально-диагностические среды*, в состав которых входят различные углеводы и индикаторы. После инкубирования в термостате учитывают результат ферментации углеводов (рис. 26).

В зависимости от изучаемого рода и вида бактерий выбирают среды с

соответствующими моно- и дисахаридами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген, инсулин и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.).

В процессе ферментации бактерии образуют *конечные продукты:* альдегиды, кислоты и газообразные продукты (CO_2, H_2, CH_4, H_2S).

Для определения ферментативных свойств используют питательные среды: полужидкие с индикатором ВР, жидкие (среда Гисса) и плотные (среды Эндо, Левина, Плоскирева и др.).

В полужидкие среды с индикатором ВР посев производится петлей, опущенной до дна пробирки. В результате ферментации углеводов индикатор изменяет свою окраску, а пузырьки газа распределяются в питательной среде и в связи с ее вязкостью могут некоторое время сохраняться в среде.

В жидких питательных средах – среды Гисса с индикатором Андредэ (можно использовать бромтимолблау, бромкрезолпурпур, лакмус и др.). Под действием образующейся при расщеплении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, то наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым» рядом. Расщепление углевода выявляют также *по образованию газа.* Наличие газа устанавливают по образованию пузырьков в средах с агаром или по скоплению его в "поплавке" на жидких средах. ***"Поплавок"*** - узкая стеклянная трубочка с запаянным концом, обращенным вверх, которую до стерилизации помещают вверх дном в пробирку со средой.

На плотных дифференциально-диагностических средах – среда Эндо, бактоагар Плоскирева, среда Левина - в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску.

Например, кишечная палочка, ферментирующая лактозу, на среде Эндо образует ярко-красные колонии; сальмонеллы, не ферментирующие лактозу, на этой среде образуют бесцветные или слегка розоватые колонии. Это объясняется тем, что бактерии, сбраживая до кислоты находящийся в этих средах молочный сахар (лактозу), образуют окрашенные колонии - кислота изменяет цвет имеющегося в среде индикатора. Колонии микробов, не ферментирующих лактозу, бесцветны.

При росте микроорганизмов, образующих амилазу, на средах с растворимым крахмалом происходит его расщепление. Об этом узнают, прибавив к культуре несколько капель раствора Люголя - цвет среды не изменяется. Нерасщепленный крахмал дает с этим раствором синее окрашивание.

Молоко при росте микробов, сбраживающих лактозу, свертывается.

Таким образом, микробы, не ферментирующие конкретный вид углевода, растут на средах, не изменяя ее цвета и без образования газа.

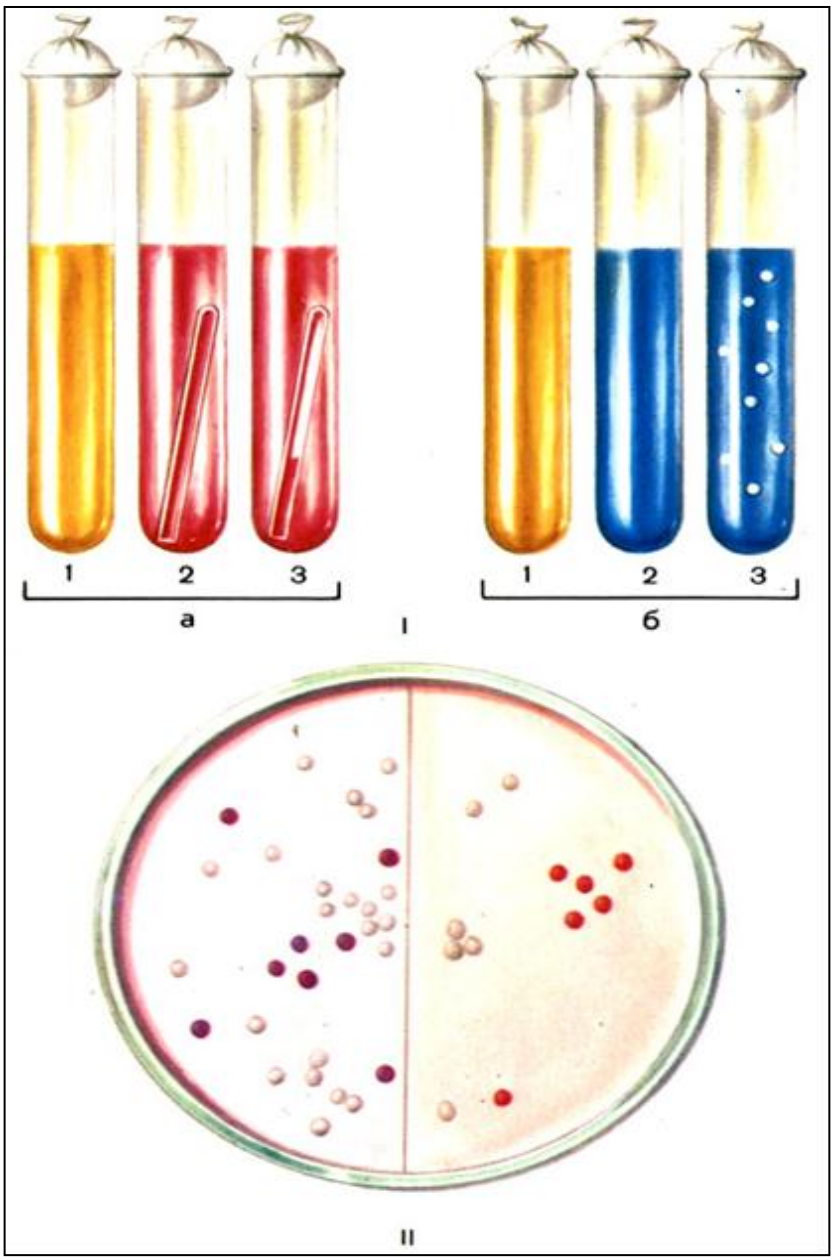


Рисунок 26 - Изучение сахаролитической активности микроорганизмов.
I *- 'пестрый ряд': а - жидкая среда с углеводами и индикатором Андреде; б - полужидкая среда с индикатором ВР: 1 - микроорганизмы не ферментируют углевод; 2 - микроорганизмы ферментируют углевод с образованием кислоты; 3 - микроорганизмы ферментируют углевод с образованием кислоты и газа;*
II *- колонии микроорганизмов, не разлагающих (бесцветные) и разлагающих лактозу (фиолетовые на среде ЭМС - слева, красные на среде Эндо – справа)*

2. Протеолетические свойства – т.е. способность бактерий расщеплять белки, полипептиды.

Для определения *протеолитической* способности микроорганимов исследуемую культуру засевают в МПЖ, простое молоко, иногда пользуются свернутой кровяной сывороткой лошади, коагулированным белком куриного яйца.

Наиболее часто для обнаружения протеолитических ферментов производят

посев чистой культуры бактерий уколом в столбик мясо-пептонного желатина, погружая петлю в глубь среды до дна пробирки. Посевы выдерживают при комнатной температуре (20-22°С) в течение нескольких дней, при этом регистрируют не только наличие разжижения, но и его характер.

В тех пробирках, где под действием ферментов произойдет *протеолиз желатины - среда разжижается*. Характер разжижения, вызываемый разными микробами, различен (рис. 27).

Разжижение может быть *послойное* (характерно для синегнойной палочки - Pseudomonas aeruginosa), стафилококки – *в виде «чулка».* Характер разжижения желатина возбудителем сибирской язвы напоминает *перевернутую елочку,* также *в виде воронки* для аэробных бактерий.

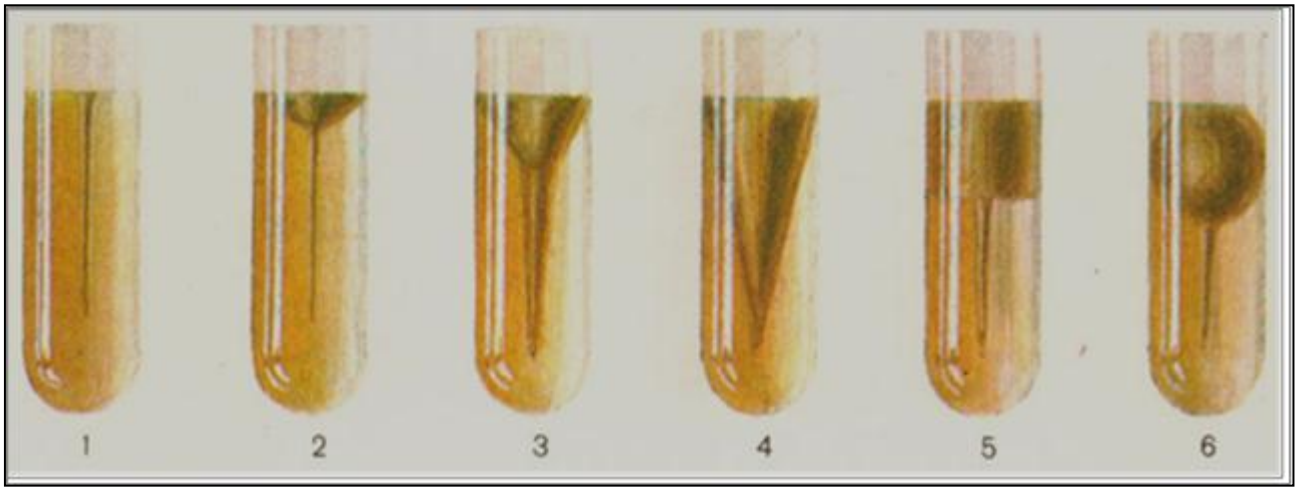


Рисунок 27 – Виды разжижения желатины под действием ферментов бактерий

Микробы, *расщепляющие казеин* (молочный белок), вызывают пептонизацию молока - оно приобретает вид молочной сыворотки. При расщеплении пептонов могут выделяться газообразные вещества – индол-C_8H_7N, сероводород-H_2S, аммиак-NH_3.

Способность микроорганизмов гидролизовать казеин определяют на *молочном агаре Эйкмана:* к 10 мл стерильно расплавленного на водяной бане МПА добавляют 3 мл стерильного обезжиренного молока и смешивают в чашки Петри, остужают. Посев осуществляют петлей и шпателем по всей поверхности среды, чтобы получить изолированные колонии. Выдерживают в термостате 24-48 ч. Протеолиз проявляется пептонизацией казеина - вокруг колоний обаразуется четкая зона просветления молочного агара.

При посеве в молоко протеолиз выражается просветлением столбика молока, появлением рыхлого или слизистого осадка на дне пробирки.

Степень протеолиза и глубину ращепления белка у разных видов бактерий определяют по образованию конечного продукта распада (индол, сероводород, аммика, и др.). Их образование устанавливают с помощью индикаторных бумажек (рис. 28).

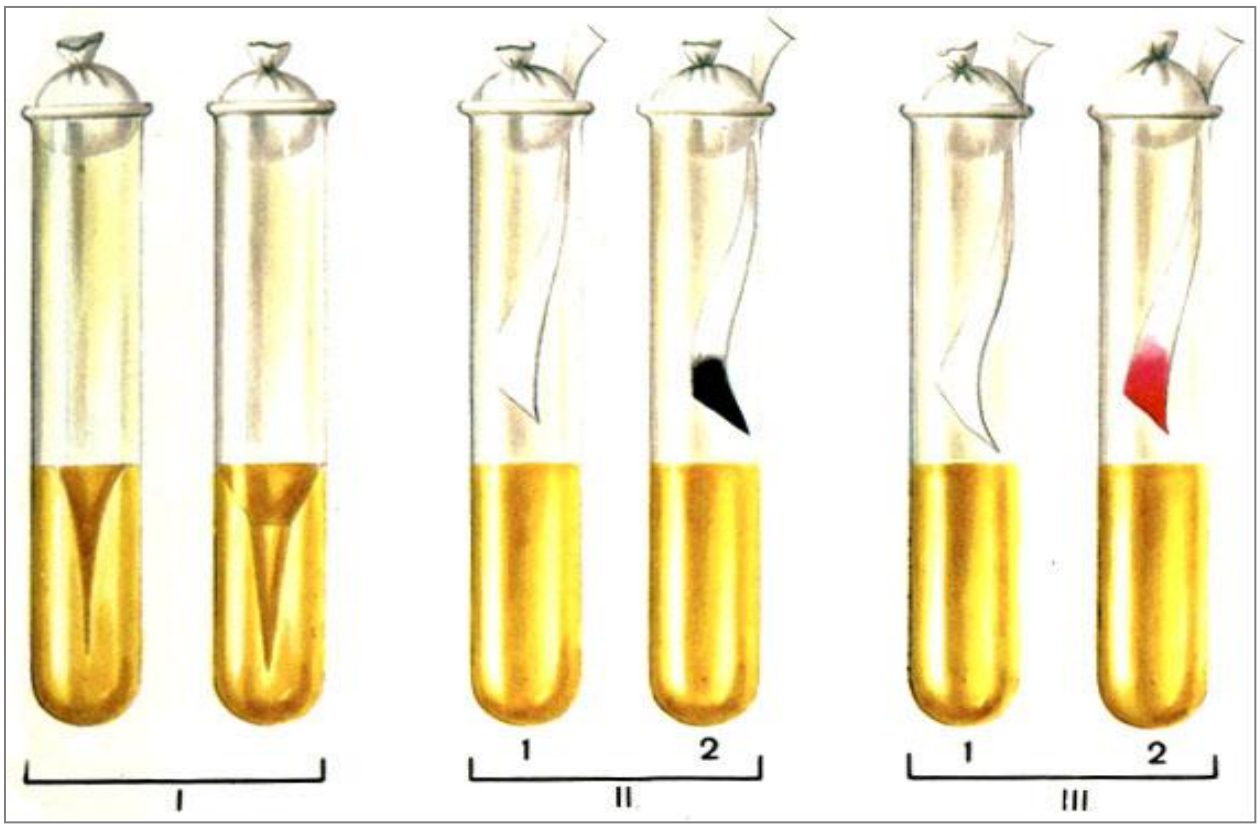


Рисунок 28 – Протеолитические свойства бактерий.

I - формы разжижения желатина; II - определение сероводорода (бумажка чернеет); III - определение индола: 1 - отрицательный результат (бумага без изменений); 2 - положительный результат (окрашивание в розовый цвет индикаторной бумажки).

Реакция на индол. 1) Фильтровальную бумагу пропитывают горячим насыщенным водным 12% раствором щавелевой кислоты, высушивают на воздухе, разрезают на полоски (10х12 см) и хранят в специальной банке с притертой крышкой. Чтобы выявить образование индола, исследуемую культуру бактерий засевают в пробирку с МПБ или бульоном Хоттингера, куда вставляют индикаторную бумажку, прижимая ее конец ватной пробкой (нижний край бумажки не должен касаться питательной среды). Выдерживают в термостате 1-3 дня при температуре 37^0С. *При наличии индолообразования* нижняя часть индикаторной бумажки окрашивается *в розовый цвет.*

2) Способ Эрлиха: фильтровальную бумагу пропитывают теплой смесью реактива Эрлиха, высушивают и помещают в пробирку с чистой культурой бактерий. *При наличии индола* нижний конец бумажки (прикрепленный, как и в предыдущщем способе) окрашивается *от темно-розового* до интенсивно-малинового цвета (другой цвет, не учитывается).

Определение сероводорода. 1) С использованием специальной плотной среды с добавлением сернокислого железа и индикатора - фенолрот. Среду разливают в стерильные пробирки и охлаждают в наклонном положении пробирки. Посев делают на скошенную поверхность агара, а затем уколом в нижнюю часть столбика среды. *При наличии сероводорода* под действием

растущей бактериальной культуры столбик среды краснеет, нижняя часть окрашивается *в черный цвет.*

2) С использованием жидкой среды (пептонная вода). В пробирку помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной 10 % раствором уксуснокислого свинца или сульфатом железа. *При наличии сероводорода* полоска фильтровальной бумажки *чернеет* (образуется сернистый свинец либо сульфид железа - черного цвета).

Реакция на аммиак. 1) В пробирке с засеянной бактериальной культурой закрепляют между стенкой пробирки и пробкой розовую лакмусовую бумажку. Окрашивание бумажки *в синий цвет* говорит *о наличии аммиака*.

2) В фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю бульонной культуры микробов и смешивают с каплей реактива Несслера. При наличии аммиака (в зависимости от его количества) культура с индикатором приобретает *желтое или коричневое окршивание.*

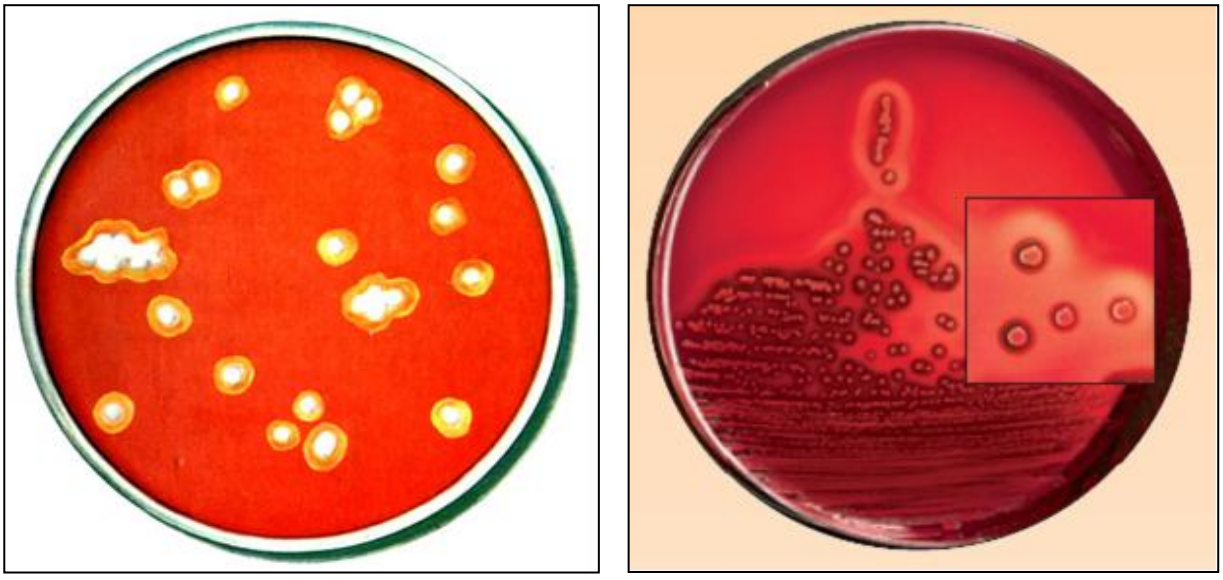
Также протеолитическое действие микроорганизмов можно наблюдать при посевах на **свернутую сыворотку крови**, вокруг колоний появляются углубления и зоны разжижения.

3. Гемолитические свойства (способность разрушать эритроциты).

Гемолитическая активность бактерий является важным показателем их вирулентности, поэтому определение гемолитических свойств в лабораториях является обязательным исследованием.

Бактерии некоторых видов в процессе жизнедеятельности продуцируют особые вещества, обладающие лизирующим действием на эритроциты - ***гемотоксины*** *(гемолизины)* – это вещества белковой природы, разрушающие оболочку эритроцитов.

Для определения гемолитической способности бактериальной культуры применяют питательные среды, содержащие 5 % дефибринированной крови - *кровяной МПА*. Посев проводят по общепризнаной методике.



а) **б)**

Рисунок 28 - Гемолиз вокруг колоний, растущих на агаре с кровью

При росте микроорганизмов, обладающих гемолитическими свойствами, вокруг колонии в результате лизиса эритроцитов образуется прозрачная зона (бесцветная или слегка окрашенная) – ***зона гемолиза*** (рис. 29 а,б).

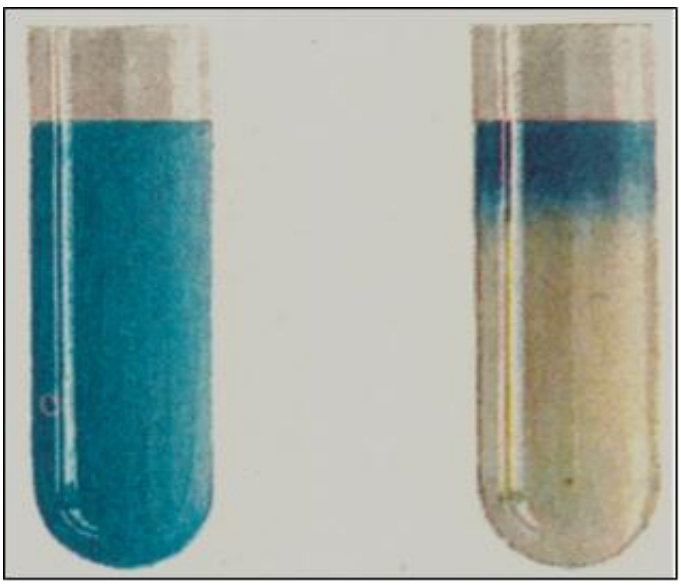
В зависимости от цвета зоны гемолиза (бесцветная, зеленая) можно определить вид гемолизина (альфа-, бета-, гамма-, дельта- и т.д.).

В жидких средах при гемолизе среда становится прозрачной (красная лаковая кровь).

4 Редуцирующие свойства - определяют на основании изменения цвета органической краски, внесенной в питательную среду (часто в молоко).

Для определение редуцирующей (восстанавливающей) способности используют красители - метиленовую синь, тионин, лакмус, нейтральный красный и др. В МПБ, или стерильное молоко добавляют раствор одного из указанных красителей. Петлю исследуемой культуры высевают в среду с красителем, инкубируют в термостате 24 часа. Под действием микробных ферментов краситель восстанавливается, происходит его обесцвечивание или изменение первоначального цвета.

Определение редуцирующих свойств на среде Минкевича (молоко с лакмусовой настойкой). Посевы инкубируют в термостате 10 дней, ежедневно просматривая пробирки. Редукция лакмуса проявляется полным обесцвечиванием молока. На этой же среде выявляют кислото- и щелочеобразование. В первом случае лакмусовое молоко интенсивно розовеет, во втором – синеет (рис. 29).



а) б)

Рисунок 29 – Редуцирующие свойства бактерий в молоке

При учете времени обесцвечивания индикатора можно оценить степень редуцирующей (воссстанавливющей) способности микроорганизмов.

В настоящее время также широкое применение имеет среда Ротбергера (МПА с 1% глюкозы и несколькими каплями насыщенного раствора

нейтрального красного). При положительной реакции красный цвет среды переходит в желтый.

5 Определение каталазной активности. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород. 1) Для обнаружения каталазы на поверхность 24-часовой культуры на скошенном МПА наливают 1-2 мл 1%-ного раствора перекиси водорода. Появление пузырьков газа при наклонном положении пробирки регистрируется как положительная реакция. В качестве контроля следует параллельно исследовать культуру, заведомо содержащую каталазу.

2) Можно на предметное стекло нанести 1 каплю 1-3% перекиси водорода и бактериальной петлей добавить культуру бактерий. Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии фермента каталазы – положительная реация на каталазу (рис. 30).

Рисунок 30 – Положительная реакция на каталазу

6. Определение плазмокоагуляции – под действием фермента патогенности бактерий – коагулазы, происходит свертывание плазмы крови.

Является одной из наиболее надежных проб для выявления патогенности стафилококков. Для ее постановки разливают по 1-2 мл стерильной плазмы, вносят бактериологической петлей культуру бактерии и помещают в термостат. Проверяют результаты через 30 мин, 2, 4 часа и на другой день. При положительной реакции происходит коагуляция (свертывание плазмы).

7. Определение фермента ДНК-азы.

К расплавленному МПА добавляют навеску ДНК из расчета 2 мг на 1 мл среды. Посевы проводят в виде полоски и помещают в термостат на 18-24 часа. На выросший стафилококк наливают 5-6 мл н. HCl. Присутствие в культуре фермента, расщепляющего ДНК, выявляется образованием прозрачных зон вокруг колоний стафилококка.

За последние годы в практике микробиологических лабораторий начали использовать **специальные тест-системы** для определения биохимических свойств бактерий: “Roche”, “API”, “Enterotest”, пластины и диски индикаторные биохимические. Они удобны для пользования, надежные, позволяют определять 12-20 и больше разнообразных признаков, значительно облегчить идентификацию микробов.

С целью установления ***видовой принадлежности бактерий*** часто изучают их **антигенное строение**, то есть проводят идентификацию по антигенным свойствам. Каждый микроорганизм имеет в своем составе разные антигенные субстанции. В частности, представители семьи энтеробактерий (ешерихии, сальмонели, шигели) содержат оболочечный - О-антиген, жгутиковый - Н-антиген и капсульный - К-антиген. Они неоднородны по своему химическому составу, потому существуют во многих вариантах. Их можно определить с помощью специфических агглютинирующих сывороток. Такое определение вида бактерий носит название **серологической идентификации** (рассмотрим в разделе III)**.** Ее относят, к одному из главных методов установления вида выделенной культуры.

Иногда идентификацию бактерий проводят, **заражая лабораторных животных** чистой культурой и наблюдая за теми изменениями, которые вызывают возбудители в организме (туберкулез, ботулизм, столбняк, сальмонеллез и тому подобное). Такой метод называют идентификацией по биологическими свойствами (этот метод мы рассмотрим в пункте 1.19).

На основании изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, биологических и других свойств микробов делают окончательный вывод об идентификации бактерии. Например: “Выделено - Escherichia coli” или “Выделенный возбудитель принадлежит к виду Staphylococcus epidermidis”.

Контрольные вопросы:

1. Методы определения сахаролитических свойств.
2. Методы определения индола, сероводорода, аммиака.
3. Как определить редуцирующие свойства микробов?
4. Определение гемолитических свойств бактерий.

1.16 Методы определения подвижности бактерий

Цель занятия. Освоить методы исследования бактерий без окрашивания, в живом состоянии.

Задание:

1 Изучить метод «висячая капля».

2 Изучить метод «раздавленная капля».

Выделив чистую культуру, на жидкой питательной среде определяют подвижность этих бактерий. Подвижность или ее отсутствие у бактерий является одним из многих признаков для определения их вида.

Органами движения у некоторых видов бактерий являются жгутики. Они состоят из белковых веществ, отличающихся от белков тела клетки. Жгутики – очень тонкие образования, диаметр их 0,02-0,05 мкм. Они во много раз длиннее бактерий. Передвижение бактерий связано со спиралевидными движениями жгутиков.

Рассмотреть жгутики у бактерий под обычным световым микроскопом

невозможно, так как их малые размеры лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Обнаруживают жгутики у бактерий различными способами. Строение их и другие детали изучаются методом электронной и фазово-контрастной микроскопии. Расположение и количество жгутиков можно рассмотреть под световым микроскопом, применяя «сверхокраску» по методу Леффлера. Сложность и недоступность этих методов исключает их использование в условиях практических лабораторий. По расположению жгутиков подвижные микробы условно разделяют на 4 группы.

1. Монотрихи – бактерии с одним жгутиком на конце.
2. Лофотрихи – бактерии с пучком жгутиков на одном конце.
3. Перитрихи – бактерии со жгутиками по всей поверхности тела.
4. Амфитрихи – имеют по жгутику на обоих полюсах клетки.

Практически изучение микробов в живом состоянии применяется для определения подвижности, то есть косвенного подтверждения наличия жгутиков. Движение микробов можно наблюдать в препаратах *«раздавленная капля» или «висячая капля».* Микроскопируют эти препараты сухим или иммерсионным объективом. Лучшие результаты получают при микроскопировании в темном поле зрения.

Препарат живых клеток микроорганизмов «Висячая капля».

На покровное стекло наносят петлей каплю суспензии из микроорганизмов и физиологического раствора. Затем его переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Края лунки предварительно смазывают вазелином, благодаря чему покровное стекло прилипает к предметному. Капля должна висеть свободно, не касаясь краев и дна лунки. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. Для длительных наблюдений используют стерильные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят на жидкой питательной среде.

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 ставят в центре поля зрения. В таком положении стекло закрепляют зажимами. После этого на покровное стекло наносят каплю кедрового масла, в которую под контролем глаза опускают иммерсионный объектив до соприкосновения со стеклом, затем, медленно поднимая конденсор и усиливая освещение частичным раскрытием диафрагмы, устанавливают фокус. Край капли позволяет быстрее установить иммерсионный объектив в фокусе.

Следует учитывать, что при активном движении с помощью жгутиков бактерии могут пересекать все поле зрения и совершать круговые движения.

Препарат «Раздавленная капля».

Раздавленную каплю готовят, накрывая покровным стеклом каплю из смеси физиологического раствора и микробов, помещенную на предметное стекло. Микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей, выращенные в жидкой

среде - стерильной пипеткой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и препарат рассматривают под иммерсионной системой микроскопа при слегка затемненном конденсоре.

Недостатком метода «раздавленной» капли является быстрое высыхание препарата. При длительном микроскопировании препарата рекомендуют смазывать края покровного стекла вазелином.

С целью выявления крупных микроорганизмов, видимых при малых и средних объективах микроскопа, препараты просматривают без покровных стекол. Приготовленному мазку дают высохнуть при комнатной температуре. Затем перед исследованием наносят каплю раствора, которую сразу же стряхивают на фильтровальную бумагу. Оставшийся на поверхности слой раствора заменяет покровное стекло.

Контрольные вопросы:

1. Методика приготовления препарата «Раздавленная капля»
2. Описать подготовку препарата «Висячая капля»
3. Недостаки препаратов при определении подвижности бактерий.

1.17 Методы стерилизации

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с основными методами стерилизации, их назначением и практическим использованием, а также с приборами для каждого метода. Усвоить правила подготовки к стерилизации лабораторной посуды и инструментов.

Задание:

1. Самостоятельно подготовить к стерилизации посуду - нарезать полосками бумагу и завернуть в нее градуированные пипетки, сделать ватные пробки к пробиркам, завернуть пробирки и пастеровские пипетки в бумагу по 10-15 штук, на ватные пробки надеть бумажные колпачки и завязать шпагатом. Все подготовленное стерилизовать в сушильном шкафу.

2. Профильтровать растворы красителей для демонстрации явления адсорбции при фильтрации.

3. Ознакомиться с устройство автоклава, кипятильника Коха и другими стерилизующими приборами.

Материальное оснащение: шприцы, иглы к ним, пинцеты, скальпели, ножницы и др.; аппарат Коха, водяная баня, сушильный шкаф (печь Пастера), автоклав для демонстрации; бактерицидные ультрафиолетовые лампы, бактериологические фильтры-Зейца; вата, чистые пипетки, градуированные и пастеровские, колбы, чашки Петри, пробирки, бумага, биксы.

Стерилизация - процесс, направленный на полное уничтожение всех живых (патогенных и непатогенных) микроорганизмов и их форм в стерилизуемых объектах, как в лабораториях, так и в промышленных условиях.

В бактериологических лабораториях стерилизуют питательные среды, стеклянную посуду (пипетки, пробирки, чашки Петри), инструменты, ватные и марлевые тампоны, и др. Для специальных условий асептической работы стерилизуют воздух и необходимые предметы в боксах.

Асептика – комплекс мероприятий, направленный на предупреждение попадания микроорганизмов в ткани и полости организма человека и животного из внешней среды при проведении лечебных или диагностических манипуляций, а также стерилизация инструментов и культур при проведении лабораторных исследований. Асептика обеспечивает соблюдение основных санитарно-гигиенических мер, чистоту рук персонала, стерилизацию материалов и интсрументов.

Антисептика – комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, вызывающих инфекционный процесс, в поврежденных участках кожи или тканях; снижение интоксикации организма, вызванной микробным заражением раны, и повышение защитных сил животного.

Дезинфекция – это комплекс мер по уничтожению патогенных микроорганизмов в окружающей среде химическими методами.

Основная цель использования стерилизации при проведении микробиологических и иммунологических исследований это препятствие проникновению микробных клеток в макроорганизм и контаминации питательных сред.

Различают физический, химический и механический методы стерилизации.

К физическим методам стерилизации относят действие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей, ионизирующей радиации, ультразвука и др. *Химические методы* используют для обработки вакцин, сывороток и других объектов, консервируемых различными антисептиками. *Механический метод* – фильтрация жидкостей через бактериальные фильтры. С помощью этого метода механически очищают жидкость от бактерий. Фильтрующиеся формы бактерий, вирусы через такие фильтры проходят.

Механизмы действия их неодинаковы, но при выборе любого из них должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химический свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации включают:

1. Стерилизация сухим жаром - фламбирование, сухим нагретым воздухом;
2. Стерилизация влажным жаром:

- кипячение;
- текучим паром при 100°С;
- дробная стерилизация при температуре ниже 100°С;
- стерилизация паром под давлением с температурой выше 100°С;

- пастеризация;
3. Облучение электромагнитными волнами:
- ультрафиолетовыми лучами;
- ультразвуком;
- гамма- и рентгеновское облучение.

1. Методы стерилизации сухим жаром

Фламбирование (от лат. *flamma* – пламя и франц. *flambé* – гореть) – стерилизация путем прокаливания в пламени мелких металлических или стеклянных предметов. Таким способом стерилизуют бактериологические петли, металлические пинцеты, стеклянные шпатели и трубочки, предметные стекла и др. Температура пламени около 1000ºС. При прокаливании сгорают все микроорганизмы (вегетативные и споровые формы). Это быстрый и надежный способ стерилизации.

Стерилизация сухим жаром. Производится горячим воздухом в печи Пастера или сушильном шкафу. Печь Пастера представляет собой шкаф с двойными стенками, покрытый снаружи асбестом для теплоизоляции. Внутри шкафа устроены металлические полки с отверстиями, на которые помещают стерилизуемый материал (рис. 31). Нагрев электрический. Стерилизация проводится при температуре 160-180ºС, в течение 1-2 часа с момента достижения этих температур (контролируется по термометру).

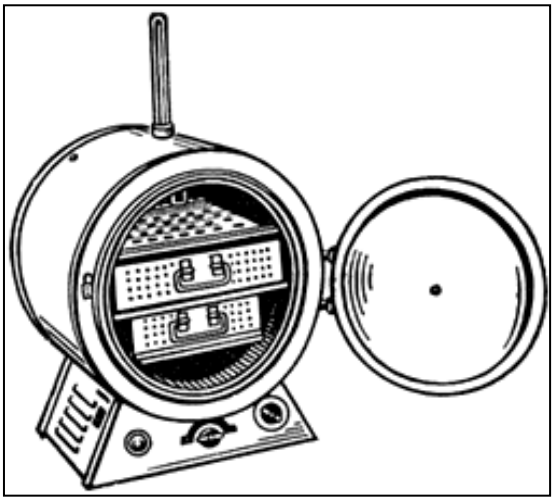


Рисунок 31 – Сушильный шкаф

Стерилизуют сухим жаром главным образом стеклянную посуду – чашки Петри, пипетки, шпатели (обернутые в бумагу), а также пробирки, колбы. Этот прием надежный – погибают неспоровые и споровые формы микроорганизмов. Обернутый в бумагу и стерилизованный материал можно хранить.

2. Методы стерилизации влажным жаром

Кипячение - один из самых простых способов стерилизации.

Проводится в стерилизаторе – металлической прямоугольной коробке с крышкой и сеткой на дне для укладывания стерилизуемых предметов. В него наливают воду и нагревают до кипения (нагрев электрический или на огне). Кипячение может длиться от 15-30 минут до 2 часов, при температуре около 100ºС (рис. 32).

Стерилизуют мелкие металлические или стеклянные предметы – шприцы, иглы, стеклянные трубки и др. При этом погибают вегетативные формы микроорганизмов и часть спор.

Практикуют также ошпаривание кипятком стерилизуемого материала.

Рисунок 32 – Стерилизаторы для кипячения

Стерилизация текучим паром. Проводится горячим влажным воздухом в *аппарате Коха*, широко применяемый в лабораторной практике.

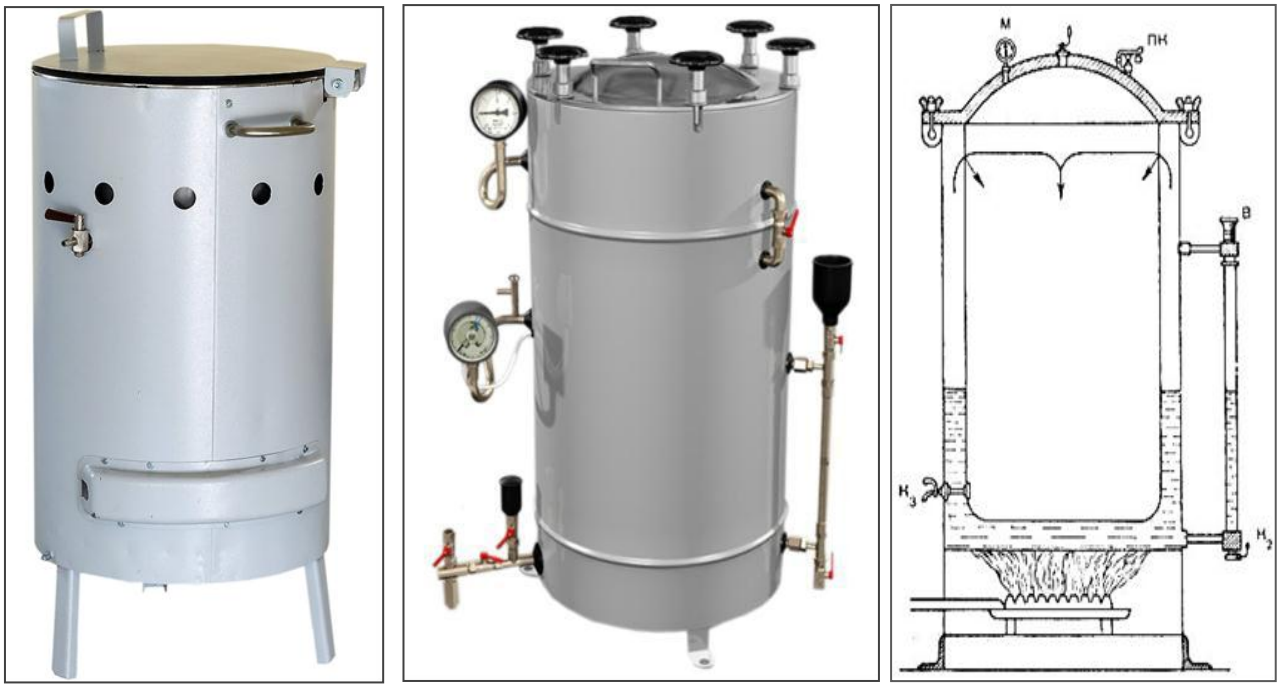
Аппарат (кипятильник) Коха представляет собой металлический цилиндр, покрытый теплоизоляционным материалом. В конической крышке аппарата имеется отверстие для выхода пара. В нижней части расположены кран и водомерная трубка. Внутри имеется подставка для стерилизуемых материалов. На дно аппарата заливается вода, которая не должна касаться стерилизуемого материала. Аппарат плотно закрывают конической крышкой с отверстием и нагревают на огне. Когда вода закипит, горячий водяной пар с температурой около 100 ºС «потечёт» сильной струей из отверстия крышки. С этого момента отмечают время начала стерилизации (рис. 33, а).

Стерилизация текучим паром продолжается от 45 минут до 1,5 часов, в зависимости от объёма стерилизуемого материала. Стерилизуют при 100°С в течение 30-60 минут, при этом – полностью погибают лишь вегетативные формы микроорганизмов, а споры сохраняются, и при комнатной температуре через сутки прорастают. Этот способ стерилизации не вполне надежен.

Для достижения полной стерилизации сред в аппарате Коха применяют *дробную стерилизацию.* Повторное воздействие паром снова обезвреживает вегетативные формы. Третье прогревание убивает все остальные бациллы, развивающиеся из спор.

Таким методом (дробно) стерилизуют питательные среды, которые нельзя нагревать выше 100ºС, и другие материалы, изменяющие свои свойства при температуре выше 100°С: молоко, желатину, картофельные среды и среды с углеводами. Например, мясо-пептонный желатин стерилизуют дробно, так как при температуре выше 100ºС желатина разжижается и не застывает.

Стерилизация текучим паром может производиться в автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране. Текучим паром стерилизуют и одновременно уплотняют сыворотки, яичные и другие среды. Свертывание сыворотки происходит при 80-90° в течение часа, в специальном двустенном свертывателе, покрытом теплоизоляционным материалом.



а) б) в)

Рисунок 32. **а)** Аппарат Коха; **б)** Автоклав; **в)** Строение автоклава

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование). Проводится насыщенным водяным паром в *автоклаве.*

Автоклавы бывают разной конструкции. *Вертикальный автоклав* представляет собой массивный двухстенный котёл, окруженный снаружи металлическим кожухом, с тяжелой откидывающейся крышкой, плотно привинчивающейся к котлу болтами. В нижней части котла имеется воронка и кран, через которые наливается вода в свободное пространство между внутренним котлом и кожухом. На дно котла укладывают стерилизуемый материал, крышку плотно завинчивают, включают электрический нагрев. Когда вода закипает, пар проходит во внутренний котел. Давление в автоклаве поднимается, одновременно повышается температура. Когда манометр покажет, что давление в котле достигло заданной величины, отмечают время начала стерилизации. Давление поддерживается на определенном уровне с помощью предохранительного клапана (рис. 32 б, в).

Обычно в лабораторной практике стерилизация под давлением производиться при 1,5-2 атм и температуре около 115-120 ºС в течение 20-30 мин. По истечении времени стерилизации нагрев прекращают, открывают паровой клапан и спускают пар.

При давлении в 0,5 атм. температура в автоклаве равна 110-112°С, в 1 атм – 120-121°С; в 1,5 атм – 124-126°С; в 2 атм – 132-133°С.

Стерилизуют в автоклаве питательные среды - МПБ, МПА, стеклянную посуду с водой, перевязочный материал, хирургические инструменты и др.

Автоклавирование является быстрым и надёжным способом стерилизации, при котором погибают все формы микроорганизмов, даже самые устойчивые споры.

Дробная стерилизация. Основана на обработке стерилизуемого материала в несколько приемов. Дробным может быть кипячение или стерилизация текучим паром в аппарате Коха. Обычно стерилизацию проводят 3 дня по 30 мин ежедневно одним из указанных способов, а в перерывах оставляют среды при комнатной температуре. Это делается для провокации роста спор в вегетативные формы и их уничтожения при последующих обработках, что повышает надёжность этих приемов.

Тиндализация – разновидность дробной стерилизации (дробная пастеризация). Прием назван в честь предложившего его английского ученого Д. Тиндаля. Проводится в водяной бане при температуре 56-58ºС в течение 1 часа с 5-7-кратным повторением через 24 часа. В интервалах между прогреваниями материал выдерживается при комнатной температуре.

Кратность прогревания зависит от применяемых температур: при 70-80°С в течение 3 дней, 60-65°С - 5 дней, 56 -58°С в течении 6-7 дней.

Тиндализации при 56-58°С подвергают материалы, разрушающиеся при более высокой температуре (коллоидные растворы, сыворотки крови и т.д.), белок содержащие вещества. В результате тиндализации достигается полное уничтожение микроорганизмов.

Пастеризация (частичная стерилизация). Этот метод был предложен французским ученым Л.Пастером и назван в честь него. В основе метода лежит сохранение питательной ценности пищевого продукта (молоко, мясные, рыбные и овощные консервы), которая снижается при кипячении.

Способ направлен на уничтожение бесспоровых/вегетативных форм, преимущественно патогенных видов, споры же сохраняются жизнеспособными.

Метод пастеризации заключается в том, что различные продукты обезвреживают однократным нагреванием до 65-70°С в течение 1 часа или до 70-80°С в течении 5-10 минут, затем резко охлаждают (до 4-8°С). Резкое охлаждение и последующее хранение при низкой температуре (4-5°С) препятствует последующему прорастанию спор.

Применяется для жидких сред и материалов, которые изменяют свои физико-химические свойства при высоких температурах.

Пастеризуют молоко, сливки, вино, пиво, соки и др. Молоко пастеризуют с целью освобождения его от молочнокислых и патогенных бактерий (возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, стафилококкозов и др.). При пастеризации пива, вина, плодовых соков уничтожаются возбудители болезней этих напитков.

При этом сохраняются витамины и вкусовые качества продуктов. Пастеризованные продукты длительному хранению не подлежат, так как при этом способе стерилизации погибают лишь вегетативные формы микроорганизмов, а споры остаются. Пастеризованные продукты хранят в условиях холодильника.

В лабораторной практике этим способом пользуются главным образом для отделения спорообразующих видов от неспорообразующих.

3. Методы облучения электромагнитными волнами:

Облучение электромагнитными волнами используют для дезинфекции, стерилизации термолабильных материалов.

- **Ультрафиолетовые (УФ) лучи** - длина волны 250 и 270 нм. Применяют бактерицидные лампы, которые широко используют для обезвреживания воздуха в боксах, операционных и других помещениях.

Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые в 3-10 раз более устойчивы.

- **Гамма- и рентгеновское облучение** широко используют для стерилизации антибиотиков, гормонов, пластмассовых изделий разового применения (шприцы, чашки Петри, пипетки и др.).
- **Ультразвук** может быть использован для обеззараживания молока, воды, других пищевых продуктов.

Химические методы стерилизации

Применение этих методов сводится к профилактике микробного загрязнения питательных сред, вакцин, диагностических и лечебных сывороток путем включения в их состав различных химических консервантов.

Питательные среды можно консервировать хлороформом, толуолом, эфиром. До посева такие среды прогревают при 56°С для освобождения от этих веществ.

В биопромышленности вакцины и лечебные сыворотки консервируют карболовой кислотой, доводя концентрацию до 0,25-0,5%, формалином - до 0,05%, мертиолятом – до 1:5000 – 1:10000.

Сыворотки консервируют борной кислотой, толуолом или глицерином.

Различные химические вещества в лабораторной практике получили широкое использование *для дезинфекции*. С этой целью применяют растворы карболовой кислоты (3-5%-ные), хлорамина (1-3%-ные), этиловый спирт (70°) и др.

К химическим методам относится и *стерилизация газами.* Стерилизующими газами являются: формальдегид, окись этилена и пропиолактон. Преимущество газов, как стерилизующих веществ состоит в том, что их применение не требует нагревания; кроме того, их можно применять для стерилизации больших объемов, например помещений. Однако при их использовании нужно соблюдать большую осторожность, так как они оказывают токсическое действие на животных и людей.

Механические методы стерилизации - основаны на фильтрации жидкостей через мелкопористые бактериальные фильтры, которые задерживают видимые под микроскопом микроорганизмы. Через них свободно проходят вирусы и микоплазмы, поэтому данные методы следует признать как *«частичную» стерилизацию*.

1. Фильтрование – один из очень удобных методов стерилизации тех жидкостей, которые нельзя простерилизовать другими способами, например, сыворотку крови, питательные среды и др.

Наиболее широко в микробиологической практике используют *фильтры-свечи и мембранные фильтры.*

Фильтры-свечи - имеют форму цилиндра с толстыми стенками и с полостью внутри. Одна группа свеч (Беркефельда) изготавливается из инфузорной земли. По величине пор в порядке уменьшения они обозначаются буквами W, N, V.

Мембранные фильтры – характеризуются ситовым механизмом и постоянным размером пор. Они нашли широкое применение, которые изготавливают из асбеста, бумаги, коллодия, ацетата целлюлозы. Обычно эти фильтры представляют собой диски различного диаметра. Такие диски пронизаны бесчисленным множеством мельчайших цилиндрических отверстий. В зависимости от способа изготовления фильтров диаметр этих отверстий может быть от 1 мкм до менее 0,005 мкм.

Фильтрацию растворов через мембраные фильтры проводят под вакуумом или под давлением. Эффективность стерилизации проверяют путем прямого посева пробы филтра на питательную среду.

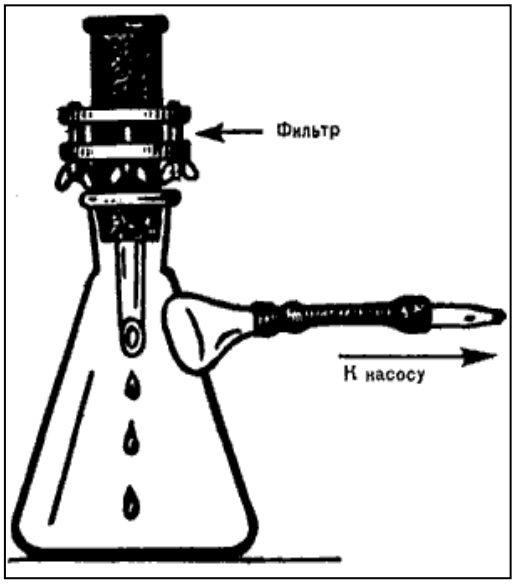


Рисунок 33 – Прибор Зейтца

В лабораторной практике мембранные фильтры монтируют в *приборе Зейтца*, который состоит из стакана (воронки) и колбы Бунзена, на тубус этой колбы надевают резиновый вакуумный шланг с ватным фильтром (рис. 33).

Жидкость, подлежащую стерилизации, наливают в воронку прибора, внутри которого создается вакуум и жидкость фильтруется, освобождаясь от бактерий.

Собранный прибор завертывается в бумагу и стерилизуется автоклавированием.

Таким образом, для качественной стерилизации необходимо лабораторную посуду вымыть и высушить. Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробирки на каждый сосуд надевают бумажный колпачок. Чашки стерилизуют завернутыми в бумагу по 2-4 штуки.

Для стерилизации пипеток в верхнюю часть каждой из них вкладывают кусочек ваты и затем заворачивают пипетки в плотную бумагу, нарезанную предварительно полосками шириной 2-2,5 см и длиной 50-70 см. На бумаге пишут объем завернутой пипетки. Пипетки можно стерилизовать также в специальных пеналах.

Контрольные вопросы:

1. Назовите методы стерилизации.
2. Автоклав, его устройство и назначение.
3. Суть метода стерилизации текучим паром, когда следует его применять?

4. Методы дробной стерилизации.
5. Бактериологические фильтры, принцип и техника фильтрации, проверка результатов фильтрации.
6. Что такое фламбирование, применение?

Задание для самоподготовки и контроля знаний

1. Стерилизацией называется:
А. Уничтожение патогенных микробов в объектах или окружающей среде.
Б. Комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на (в) какой-либо объект.
В. Полное уничтожение в объекте всех жизнеспособных микробов и их спор.
2. К физическим методам стерилизации относят:
А. Гамма-лучи.
Б. Газовую стерилизацию.
В. Высокую температуру.
Г. Фильтрование через бактериальные фильтры.
Д. Ультрафиолетовые лучи.
3. В автоклаве при 1,0 атм (120°) в течение 15 мин стерилизуют:
А. Простые питательные среды (МПА и МПБ).
Б. Сывороточные среды.
В. Физиологический раствор.
Г. Среды с углеводами.
Д. Отработанный материал (культуры микробов, трупы лабораторных животных и т.д.)
4. В сушильных шкафах сухим жаром стерилизуют:
А. Стеклянную посуду.
Б. Простые питательные среды (МПА и МПБ).
В. Вату, марлю.
Г. Термостойкие порошкообразные лекарственные вещества.
5. Споры бацилл погибают при:
А. Автоклавировании.
Б. Пастеризации.
В. Стерилизации сухим жаром.
Г. Длительном высушивании.
6. Каким из перечисленных методов стерилизации воспользовались, если применили следующий режим работы: дробная стерилизация при температуре 56-58° в течение 5-6 дней?
А. Автоклавирование.
Б. Пастеризация,
В. Тиндализация.
Г. Кипячение.
7. Каким из перечисленных методов стерилизации воспользовались, если применили следующий режим работы: при 1 атм - 120° в течение 20 мин?
А. Кипячение.
Б. Пастеризация.

В. Автоклавирование.
Г. Дробная стерилизация текучим паром.
8. Какой из методов наиболее приемлем для уничтожения бактериальных культур?
А. Пастеризация.
Б. Автоклавирование.
В. Фильтрование через бактериальные фильтры.
Г. Тиндализация.
9. Каким из перечисленных методов стерилизации воспользовались, если применили следующий режим работы: при температуре 100° в течение трех дней подряд по 30 мин в день?
А. Кипячение.
Б. Автоклавирование.
В. Пастеризация.
Г. Дробная стерилизация текучим паром.
10. Назовите режим работы, применяемый для пастеризации:
А. 100° - 30 мин.
Б. 60° - 20 мин.
В. 80° - 10 мин.
Г. 80° - 30 мин.
11. Назовите нормальный режим работы автоклава при стерилизации инфицированного материала:
А. 80° при давлении в 1,0 атм.
Б. 56° при давлении в 0,5 атм.
В. 126° при давлении 1,5 атм.
Г. 126° при давлении 2,0 атм.
12. Какой из перечисленных методов нужно применить для стерилизации питательных сред с углеводами:
А. Дробная стерилизация текучим паром.
Б. Кипячение.
В. Пастеризация.
Г. Автоклавирование.
13. Каким методом можно пастеризовать сыворотку крови:
А. Кипячением.
Б. Методом тиндализации.
В. Пастеризацией.
Г. Фильтрацией через бактериальные фильтры.
14. Дезинфицирующими веществами являются:
А. Хлорамин.
Б. Эритрин.
В. Стрептомицин.
Г. Фенол.
Д. Бриллиантовая зелень.

1.18 Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Цель занятия. Овладеть методами определения чувствительности и устойчивости бактерий к антибиотикам.

Задание:

1. Засеять бактериальные культуры на МПА чашках Петри.

2. Наложить стандартные диски с четырьмя или пятью антибиотиками на поверхность агара с ростом колоний бактерий.

3. Освоить технику определения зоны задержки роста бактерий вокруг диска (на демонстрационных чашках).

Материальное оснащение: для самостоятельной работы на группу (по 2-3 человека) обучающихся необходимо иметь две стерильные чашки Петри с МПА (рН 7,2 - 7,4), по пробирке с чистой культурой золотистого стафилококка и эшерехий (или сальмонелл), заштрихованные под номерами 1 и 2; две мерные стерильные пипетки на 2,0, стерильный пинцет, стандартные диски, с разными антибиотиками, стерильные пастеровские пипетки, резиновую грушу, линейку (или полоску миллиметровой бумаги 5 см). Для демонстрации в лаборатории должны быть таблицы, две чашки Петри с суточной агаровой культурой золотистого стафилококка (тест-микроб) с бумажными дисками, пропитанными растворами пенициллина в разных концентрациях; две чашки Петри с МПА: в одной суточная (или 18-часовая) культура E. coli или сальмонелл, в другой - золотистый стафилококк с дисками разведенных антибиотиков; пробирки с МПБ, содержащим серийно разведенный пенициллин и культуру золотистого стафилококка.

Очень важным при выделении чистой культуры бактерий является определение *их чувствительности к антибиотикам* с целью выбора оптимального препарата для последующего лечения.

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности бактерий, грибов, растений (фитонциды) и животных, обладающие активностью по отношению к микроорганизмам определенных групп, способные задерживать их рост *(бактериостатическое действие)* или полностью подавлять их жизнедеятельность *(бактерицидное действие)*. Механизм антагонистического действия антибиотиков сводится к нарушению процессов обмена веществ в микробной клетке.

Источником получения антибиотиков являются микроскопические грибы (пенициллин), актиномицеты (стрептомицин, тетрациклин), бактерии (грамицидин, полимиксин). Антибиотические вещества извлекают и из клеток растений (фитонциды лука, чеснока) и животных тканей (лизоцим, экмолин).

Антибиотики-это лекарственные препараты, обладающие антимикробным действием. Они получили широкое применение для терапии многих болезней животных и человека. С каждым годом расширяется арсенал антибиотических препаратов, выпускаемых промышленностью.

Создание большого количества разнообразных антибиотиков вызвано, с одной стороны, поисками все более эффективных лечебных средств, а с другой,

тем, что по мере широкого применения антибиотиков их лечебный эффект снижается вследствие возникновения *резистентных (устойчивых) форм* микробов.

Антибиотики готовят промышленным путем в виде солей натрия, калия, кальция и выпускают в специальных упаковках. При выпуске антибиотика (промышленном или лабораторном) обязателен контроль его активности.

Биологическую активность антибиотиков выражают в ***единицах действия (ЕД),*** содержащихся в 1 мл раствора (ЕД/мл) или в 1 мг препарата (ЕД/мг).

За одну единицу действия (1 ЕД) принимают минимальное количество антибиотика, которое подавляет рост стандартного тест-микроба в строго определенном объеме питательной среды.

При установлении активности антибиотика используют определенный для него тест-микроб, обладающий самой высокой чувствительностью к данному антибиотику. Например, для пенициллина тест-микробом является золотистый стафилококк - штамм 209-Р, для тетрациклина и стрептомицина - штаммы B. subtilis, для левомицетина, биомицина E. coli.

Установлено, что большинство антибиотиков в 1 мл вещества содержит 1000 ЕД. Единица биологической активности у разных антибиотиков разная: 1 ЕД пенициллина эквивалентна 0,6 мкг; стрептомицина - 1 мкг; неомицина - 3,3 мкг чистого вещества. Весовое количество антибиотика, эквивалентное его 1 ЕД, называют *международной единицей (МЕ)* действия.

Эффективность применения антибиотиков во многом зависит от чувствительности возбудителя болезни к применяемому антибиотику, поэтому **возникла необходимость определения чувствительности микроорганизмов** к этим препаратам.

В лабораторной практике для определения чувствительности бактерий к антибиотикам используют **следующие методы:**

1) Метод серийных разведений;

2) Метод диффузии в агар (диско-диффузионный метод или метод стандартных бумажных дисков).

Метод серийных разведений

Включает следующие основные этапы: выбор питательных сред, приготовление растворов антибиотиков, подготовка микробных культур для исследования и учет результатов.

Питательная среда должна обеспечивать оптимальный рост культуры микроорганизма (возбудителя болезни).

Для аэробных бактерий в основном используют:

- Жидкие питательные среды - МПБ (pH 7,2-7,4) и бульон Хоттингера с содержанием 180-200 мг % аминного азота (pH 7,4-7,6);
- Плотные питательные среды - 2% МПА или 2% агар на переваре Хоттингера с содержанием 120-140 мг% аминного азота; 2% МПА с добавлением 5% крови или сыворотки крови.

Для анаэробных микроорганизмов используют среду Китта-Тароцци без кусочков печени с добавлением 0,5% глюкозы (pH 7,4-7,6).

Ход работы. *В жидкой среде* при определении чувствительности одного

штамма бактерий к одному антибиотику необходимо иметь шесть пробирок с 2 мл среды в каждой (для серийного разведения антибиотика), две пробирки по 9-10 мл среды для разведения культуры бактерий и колбу с питательной средой для приготовления рабочего раствора антибиотика (рис. 34).

Сначала готовят его основной раствор (используя также стандарты антибиотиков определенной активности) из расчета 1000 мкг антибиотика в 1 мл растворителя (дистиллированной воды, буферного раствора). Рабочие растворы готовят на питательной среде из основного раствора методом последовательных двукратных разведений, чтобы в 1 мл концентрация антибиотика была соответственно, начиная с 1-ой пробирки - 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015; 0,07 мкг.

Рисунок 34 – Метод серийных разведений в жидкой среде

При использовании *плотной среды* рабочие разведения антибиотиков готовят в шести пробирках так, количество препарата в первой пробирке было 400 , во второй - 200, в третьей - 100, в четвертой - 50, в пятой - 25, в шестой - 12,5 мкг/мл. Из каждой пробирки по 1 мл разведенного антибиотика стерильной пипеткой переносят в чашку Петри и добавляют в нее 19 мл расплавленного (и охлажденного до 55°С) МПА вращательными движениями смешивают и оставляют на столе до затвердения среды. Концентрация препарата в чашках Петри становится в 20 раз ниже, чем в пробирках (соответственно 20;10;5;2,5;1,25 и 0,6 мкг/мл).

В ряды пробирок или чашек Петри с питательной средой, содержащие разведенный антибиотик, засевают чистую 16-18 часовую бульонную культуру микроба, выделенную из исследуемого материала, разведенную до нужной концентрации в соотвествии со стандартом мутности. Если культура выращена на плотной среде, готовят ее смыв, доводят до нужной концентрации 500 мл микробных тел в 1 мл и засевают, как указано выше. После 16-18 часового инкубирования посевов в термостате при 37°С, учитывают результат. Отмечают пробирку (или чашку), в которой отсутствует рост. Количество антибиотика в ней и последующей пробирке (чашке), где наблюдается рост бактерий складывают, выводят среднее арифметическое, которое показывает

чувствительность микроорганизма к данному антибиотику. Наличие роста бактерий свидетельствует об их резистентности к данному препарату, а отсутствие роста является показателем высокой чувствительности бактерий к антибиотику.

Метод диффузии в агар (диско-диффузионный метод)

Наиболее прост и доступен метод определения чувствительности бактерий с помощью бумажных дисков, пропитанных антибиотиками (рис. 35).

Для этого в стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, разливают по 15 мл МПА или другой питательной среды. Среда подсушивается в термостате и засевается исследуемым материалом(культура бактерий) методом «газона».

Для посева используют взвесь патологического материала (кал, молоко, гной, моча и др.) или выделенную чистую культуру возбудителя. Бактериальную взвесь равномерно распределяют по поверхности плотной питательной среды с помощью шпателя и чашки Петри, подсушивают вновь в термостате.

На поверхности засеянного агара пинцетом раскладывают бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками – по 5-6 дисков на каждую чашку на расстоянии 25 мм от центра чашки. Посевы инкубируют в термостате при оптимальной температуре - 37°С в течение 16-18 часов, после чего учитывают результаты опыта. Производят измерение ***зоны задержки роста микробов*** вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самого диска. Размер зон зависит от степени чувствительности возбудителя к данному антибиотику: *чувствительные бактерии, умеренно резистентные или стойкие штаммы.*

При зоне диаметром до 10 мм штамм расценивается как устойчивый;

11-15 мм - как малоустойчивый (умеренно резистентный);

15-25 мм - как чувствительный.

Зоны, превышающие 25 мм, свидетельствуют о высокой чувствительности микроорганизма к данному антибиотику (рис. 36).

Рисунок 35 – Стандартные бумажные диски с антибиотиками

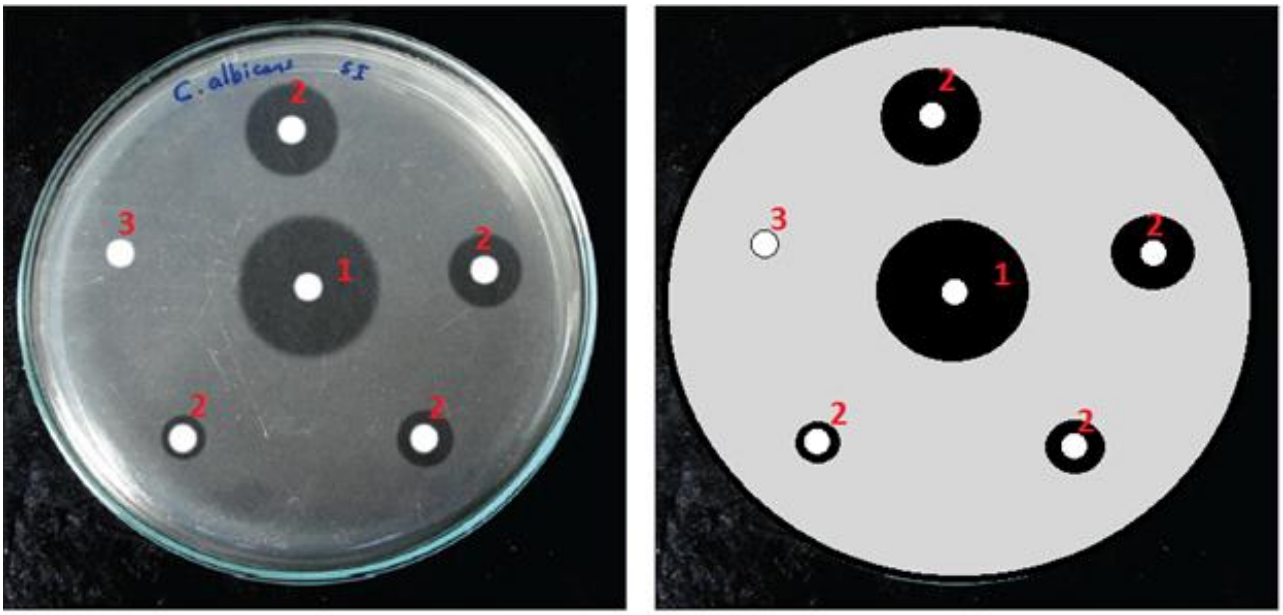


Рисунок 36 – Метод диффузии в агар:
1 – высокая чувстствительность бактерий к антибиотику;
2 – умеренная чувстствительность бактерий к антибиотику;
3 – устойчивость/резистентность бактерий к антибиотику.

Контрольные вопросы:
1. Дать определение антибиотикам.
2. Единицы измерения активности антибиотиков.
3. Методы определения активности антибиотиков.
4. Методы определения чувствительноти бактерий к антибиотикам.

Задание для самоподготовки и контроля знаний
1. Как проявляется бактериостатическое действие антибиотиков на бактерии в питательных средах:
А. В задержке роста бактерий.
Б. В гибели бактерий.
В. В стимуляции их роста.
2. В изучаемой культуре после добавления антибиотика наблюдалась задержка роста через 24 часа (МПБ прозрачный), при дальнейшем культивировании в пробирке появилось помутнение. Какое действие антибиотика проявилось?
А. Бактерицидное действие.
Б. Бактериостатическое действие.
3. При определении чувствительности культуры стафилококка к неомицину методом серийных разведений в МПБ приготовили рабочие разведения антибиотика:
1. 8 ЕД/мл; 2. 4 ЕД/мл; 3. 2 ЕД/мл; 4. 1 ЕД/мл;
5. 0,5 ЕД/мл; 6. 0,25 ЕД/мл; 7. 0,125 ЕД/мл.

После посева культуры и суточного роста установили отсутствие роста в первых четырех пробирках. Определите бактериостатическую дозу антибиотика:

А. 8.	Б. 4.	В. 2.	Г. 1.	Д. 0,5.	Е. 0,25.	Ж. 0,125 ЕД/мл.

4. При определении чувствительности бактерий к пенициллину методом диффузии в МПА установлено, что диаметр зоны задержки бактерий равен 8 мм. Какова степень чувствительности бактерий к антибиотику?

А. Устойчивые.

Б. Малочувствительные.

В. Чувствительные.

Г. Высокочувствительные.

5. При исследовании кала от больного колибактериозом теленка на чувствительность микрофлоры к антибиотикам методом диффузии в МПА установлено, что зона задержки роста бактерий с пенициллином составляла 8 мм, левомицетином – 23 мм, биомицином – 32 мм. Какой антибиотик может быть рекомендован для лечения?

А. Пенициллин.

Б. Левомицетин.

В. Биомицин.

С. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

1.19 Лабораторные животные. Методы заражения животных

Цель занятия. Освоить способы заражения лабораторных животных, методы определения абсолютной летальной дозы микроорганизмов и бактериологического исследования трупов животных.

Задание:

1. Освоить метод заражения лабораторных животных в кожу.
2. Освоить метод внутримышечного заражения у кролика и голубя.
3. Освоить метод внутрибрюшинного заражения белой мыши.
4. Освоить метод внутривенного заражения кролика.
5. Освоить метод интраназального заражения морской свинки.

Материальное оснащение: лабораторные животные (мыши белые, морские свинки, кролики, голуби), бактериальная культура, пробирки, стерильный физиологический раствор, инъекционные иглы и стерильные шприцы, ватные тампоны, спирт.

В лабораторной диагностике инфекционных болезней одним из важных методов является **биологический метод** или **биопроба** (заражение чувствительных лабораторных животных).

Экспериментальное заражение лабораторных животных производится с **целью:**

- выделения из исследуемого материала чистой культуры возбудителя болезни;
- определения вида бактерий при диагностике болезни, т.е. идентификации;
- определения вирулентности бактерий;
- испытания на эффективность вакцин и лечебных сывороток.

Заражение животных с целью выделения чистой культуры патогенного микроорганизма, вызвавшего заболевание, производят в том случае, если в исследуемом материале содержится посторонняя микрофлора, которая на питательных средах подавляет рост возбудителя. Например, при исследовании несвежего патологического материала или объектов внешней среды на наличие возбудителей сибирской язвы заражают белых мышей или морских свинок.

Для заражения используют лабораторных животных различных видов - мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов, голубей, кошек, собак, кур и др. В опыт берут животных одного вида, возраста и веса.

Лабораторных животных используют в зависимости от чувствительности к исследуемому виду микроорганизма, а в отдельных случаях – прибегают к заражению естественно-восприимчивых животных (свиней, крупный рогатый скот, овец и т. д.).

Если изучают выделенную культуру микроорганизма, то для заражения берут 18-24 часовую агаровую или бульонную культуру бактерий. При заражении животных используемым материалом (ткани органов, гной, слизь, кровь и т. д.) последний растирают в ступке со стерильным физиологическим раствором. У зараженных животных возникает септицемия – размножение микробов в крови. Зараженные животные погибают через 1-3 суток. Чистая культура возбудителя выделяется путем посева на питательные среды крови из сердца и внутренних органов.

Заражение животных производится также для исследования материала, содержащего незначительное количество микробов или их фильтрующие формы, которые не удается выделить при культивировании на питательных средах. Так, например, если при микроскопическом исследовании мокроты или осадка мочи не удается обнаружить микобактерии туберкулеза, этим материалом заражают морскую свинку. У экспериментального животного через 4-6 недель развивается генерализованный инфекционный процесс. При вскрытии во всех внутренних органах обнаруживают туберкулы (бугорки), при микроскопическом исследовании которых выделяют большое количество туберкулезных микобактерии.

Экспериментальное заражение производят при изучении заболеваний, вызванных вирусами и риккетсиями, в тех случаях, когда возбудители не могут быть обнаружены другими путями. Воспроизведение типичного заболевания у животного подтверждает присутствие вируса в исследуемом материале.

Кроме того, *заражение животных применяют для определения вирулентности микробов, выделенных из исследуемого материала.*

В микробиологической работе используют животных также с целью получения иммунных сывороток и вакцин, изучения их эффективности и безвредности (контроль биологических препаратов), взятия крови, необходимой для проведения серологических реакций, и приготовления

специальных питательных сред.

Перед заражением животных подготавливают. *Метят*: кроликов и морских свинок - металлическими ушными номерами; мышей и крыс - раствором краски (фуксин, метиленовый синий и т.д.). Для удобства и безопасности животных *фиксируют.* Для этой цели используют специальные станки, доски-фиксаторы, ящики. Кроликов и морских свинок помощник кладет спиной на стол, одной рукой держит за задние конечности, а другой обхватывает грудную клетку, вводя пальцы в подмышечные впадины.

Мышь берут одной рукой за кончик хвоста, другой за кожную складку затылка, плотно прижимают голову к поверхности стола, другой рукой держат за хвост и поворачивают в удобное для заражения положение, оттягивают корнцангом голову.

Для взятия крови из сердца животных кладут на спину, растягивая в стороны и немного вверх передние конечности. Для внутривенных инъекций удобнее всего кролика завернуть в полотенце, тесно прижав конечности к туловищу.

Методы заражения лабораторных животных

- кожный - накожный (скарификация), внутрикожный, подкожный;
- внутримышечный;
- внутрибрюшинный;
- интраназальный (через носовую полость);
- оральный (через ротовую полость);
- интрацеребральный;
- интракардиальный;
- в переднюю камеру глаза.

Инструменты для заражения должны быть стерильными (шприцы, иглы, ланцеты, пинцеты и др.).

Скарификация - скальпелем делают небольшие надрезы кожи (насечки) и в них втирают жесткой щеточкой исследуемый материал или бактериальную культуру. Шерсть на месте заражения предварительно выстригают и кожу дезинфицируют.

Внутрикожное заражение - применяется значительно реже. Кожу растягивают двумя пальцами левой руки или натягивают на палец, как перчатку. Иглу вводят под острым углом отверстием кверху в поверхностный слой эпидермиса так, чтобы конец иглы просвечивался. При введении жидкости появляется пузырек - небольшая припухлость величиной с горошину, который не исчезает в течение 5 минут. Это показатель правильного введения. Внутрикожно вводят материал в объеме 0,1-0,2 мл.

Подкожное заражение - пальцами левой руки оттягивают кожу, и в образовавшийся "кармашек" - складку вводят иглу шприца, затем его содержимое. Место заражения у кроликов со стороны спины, несколько сбоку, у белых мышей и крыс - со спины к основанию хвоста. Объем вводимого вещества не более 0,1 – 0,2 мм для мышей, для крыс, морских свинок не должен превышать -1 мл, кроликов - 10 мл.

Внутримышечное заражение - материал вводят в мышцу с внутренней поверхности бедра. Голубей и кур заражают и в грудную мышцу. Объем вводимого материала мышам 0,5 мл, морским свинкам и крысам - 5-8 мл, большие дозы следует вводить дробно в 2-3 места.

Внутрибрюшинное заражение - животное фиксируют головой вниз, иглу шприца вводят в нижнюю треть живота, чуть отступая от белой линии. Доза не должна превышать 0,1-0,2 мл. ***Внутривенно*** исследуемый материал вводят кроликам в краевую вену уха, мышам и крысам в вену хвоста. Перед заражением место инъекции протирают тампоном, смоченным ксилолом или теплой водой, чтобы вызвать наполнение сосудов кровью.

Интрацеребралъное заражение проводят на животных, фиксированных в спинном положении. У кроликов для этой цели трепанируют череп в участке между надбровным углом и черепным гребнем. После операции выстригают и дезинфицируют кожу, пальцами левой руки растягивают ее над глазницей паралелльно черепному гребню и рассекают (края раздвигают), крестообразно рассекают надкосницу, маленьким трепаном осторожно прикалывают черепную кость, легким осторожным поворотом выпиливают диск и этот небольшой кусочек кости извлекают. Шприцем вводят 0,2 мл исследуемого материала. После этого соединяют края надкосницы, кожную рану закрывают тампоном и заливают коллодием. У мышей и крыс трепанацию не делают, а легким проколом костной ткани черепа вводят кончик тонкой иглы и инъецируют материал.

Интраназальное заражение осуществляется капельным способом, используя глазную пипетку. Предварительно животное слегка наркотизируют, прикладывая к носу вату, смоченную эфиром.

При ***оральном заражении*** исследуемый материал добавляют в корм, воду или через небольшой зонд.

Методы заражения- *субдуральное* (под твердую мозговую оболочку), *интрацеребральное* (внутрь мозга), *интраокулярное* (в переднюю камеру глаза), *оральное* (через пищеварительный тракт), в дыхательные пути производят в тех случаях, когда иной путь введения не вызывает у экспериментального животного типичного инфекционного процесса.

Бактериологическое исследование трупа животного

Основной **целью** бактериологического исследования трупа является обнаружение микроба, вызвавшего гибель животного, выделение его в чистой культуре и определение места локализации возбудителя

При вскрытии трупа животного необходимо ***соблюдать ряд условий.***

1. Вскрытие следует производить как можно быстрее после гибели животного, так как кишечная флора быстро проникает в ткани, кровь, органы. При комнатной температуре это происходит через 10-18 часов, а при температуре холодильника – через 20-22 часа. Труп до вскрытия сохраняют на холоде.

2. Вскрытие трупа, взятие материала для исследования производят с соблюдением правил *асептики*. Инструменты используют только стерильные и меняют при вскрытии каждой полости или каждого органа.

3. Необходимо исключить возможность заражения работающих и загрязнение окружающих предметов. Перед вскрытием трупы мелких животных погружают в дезинфицирующий раствор, у более крупных животных шерсть увлажняют этим раствором. Вскрывают трупы на хорошо выстроганной окрашенной доске, помещенной в металлическую ванночку или кювету с дезинфицирующим раствором. После окончания вскрытия труп уничтожают.

4. Все данные вскрытия обязательно протоколируют. Записи должны быть подробными и четкими. В протоколе отмечают дату заражения и описание материала, которым производили заражение.

Порядок вскрытия. Тело лабораторного животного фиксируют в спинном положении на доске или кювете с парафином. Растягивают в стороны лапы и фиксируют препаровальными иглами или острыми гвоздями.

Кожно-шерстный покров дезинфицируют 5% раствором фенола или лизола. Разрезают кожу по белой линии от промежности до грудино-ключичного сочленения. Затем кожу отделяют от мышц, делают поперечные надрезы и кожные лоскуты отводят в сторону. Пинцетом захватывают мечевидный отросток, под ним надрезают мышцы, ножницами с обеих сторон рассекают ребра, грудину откидывают кверху. Первоначально вскрывают *грудную полость.* Учитывают патологоанатомическую картину, записывают данные в журнале экспертизы.

Поверхность сердца, легких, лимфатических узлов прижигают раскаленным штапелем, пастеровской пипеткой прокаливают в этом месте орган, насасывают небольшое количество крови (тканевой пульпы) и высевают ее на питательные среды, соблюдая осторожность.

Затем вскрывают *брюшную полость.* Пинцетом оттягивают вверх брюшную стенку и ножницами разрезают ее от диафрагмы до анального отверстия (не повредить кишечник!). Осматривают органы брюшной полости, отмечают размеры, цвет и консистенцию паренхиматозных органов, состояние кишечника, наличие экссудата в брюшной полости и его характер. Также после прижигания поверхности делают посевы из печени, почек, селезенки, лимфатических узлов, в случае необходимости - из содержимого кишечника и других органов.

Параллельно из тканей органов готовят мазки-отпечатки для микроскопического исследования: стерильными ножницами отрезают кусочек органа и к поверхности разреза несколько раз отдельными участками прикладывают предметное стекло; препарат подсушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают, микроскопируют.

По аналогичной схеме исследуют трупы естественно-восприимчивых животных, а также отдельные органы животных (патологический материал), поступающие в лабораторию для исследования. Всю работу с трупами животных проводят, соблюдая меры, предупреждающие распространение возбудителя инфекции. После окончания исследования трупа кюветы, доски, рабочий стол дезинфицируют. Инструменты стерилизуют. Трупы животных и отдельные органы обезвреживают автоклавированием или сжигают в трупосжигательной печи.

Контрольные вопросы:
1. С какой целью проводят экспериментальное заражение животных?
2. Виды лабораторных животных, используемых для заражения.
3. Способы заражения лабораторных животных.
4. Методика бактериологического исследования трупа животного.

1.20 Методы определения патогенности микроорганизмов

Цель занятия. Изучить методы изучения патогенных свойств бактерий и определения абсолютной летальной дозы микроорганизмов.

Задание:

1. Знать понятия патогенности и вирулентности микроррганизмов.
2. Уметь определять летальную и инфицирующую дозу.

Понятие патогенности и вирулентности бактерий

У лабораторных животных течение инфекционного процесса можно создать путем исскуственного заражения.

Инфекция или инфекционный процесс (от лат. *infectio* - заражать, загрязнять) - это совокупность явлений, возникающих и развивающихся в макроорганизме при внедрении и размножении в нем болезнетворных микроорганизмов.

Крайней степенью выраженности инфекционного процесса является ***инфекционная болезнь.***

Патогенность (от лат. *pathos* - страдание, *genos* - рождение) - способность микроорганизмов вызывать патологические процессы в макроорганизме, т. е. инфекционное заболевание. Микроорганизмы, обладающие этой способностью, называются *патогенными.* Это генетически обусловленный видовой признак.

Для большинства патогенных микроорганизмов характерна ***специфичность*** – это способность конкретного вида микробов вызывать определенное заболевание. Например, холеру вызывает холерный вибрион, гонорею - гонококк и т.д.

Разные штаммы одного и того же вида бактерий могут обладать различным по патогенности действием. Степень или мера патогенности называется *вирулентностью***.**

Вирулентность – это индивидуальный признак, специфичный для каждого вида микроба, мера его патогенности. Способность бактерий в спонтанных условиях вызывать инфекционную болезнь обусловлена наличием *отдельных факторов вирулентности*: токсинов, ферментов, адгезии (прилипанию), колонизации (размножению), инвазии (проникновению в ткани и клетки макроорганизма) и подавлению фагоцитоза.

Вирулентность можно усиливать путем пасссажа (повторного введения) микроорганизмов через чувствительных к ним животных.

Если у микроба нет вирулентности, то он не сможет вызвать инфекционный процесс.

Определения патогенности микроорганизмов

При изучении свойств патогенных микробов в ряде случаев производят определение их вирулентности. Это необходимо для идентификации микробов, выделенных от больных, носителей или из внешней среды, характеристики силы вакцины, выявление напряженности иммунитета у животных и т.д.

В таких случаях вирулентность (токсичность) микроорганизма измеряют в специальных условных единицах:

- **DLm *(dosis letalis minima)*** – минимальная смертельная доза, то есть минимальное количество микробов, вызывающих гибель определенного вида животного;
- **LD_{50}** – *средняя летальная доза*, вызывающая гибель 50% зараженных животных;
- **DcL*(dosis certae letales)*** – *абсолютная летальная доза* - вызывает гибель 100% зараженных животных.

LD_{50} является наиболее точным показателем, поскольку отражает чувствительность к возбудителю (или его токсину), большинства взятых в опыт животных, а DcL и DLm - показывают чувствительность наиболее устойчивых особей.

Рассмотрим методику определения DLm.

Для этой цели пользуются культурами, выращенными на плотных или жидких питательных средах. Культуры на плотных питательных средах смывают 0,85%-ным раствором поваренной соли и устанавливают определенное количество микробных тел в 1 мл, пользуясь оптическим стандартом мутности. В первый ряд пробирок наливают пипеткой 1,8 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 0,2 мл из основного разведения культуры микроба, получая разведение 500 млн. микробных тел. Далее делают разведение 250, 125, 62,5 млн/мл и т.д., каждое разведение готовят отдельной стерильной пипеткой. Содержимое каждой пробирки вводят подкожно белым мышам массой 18-20 г в объеме 0,5 мл.

За животными наблюдают в течение 10 дней, отмечая погибших животных. Минимальное количество микробов, вызвавшее гибель белой мыши, принимается за MLD. Полученные данные суммируют в виде таблицы.

Определение вирулетности микроорганизма в опыте при заражении лабораторных животных

Количество взвеси бактерий, введенной животным	Количество животных в группе	Результат заражения
500 мл	4	4/4
250 мл	4	3/4
125 мл	4	2/4
62,5 мл	4	0/4

Примечание: Числитель - число погибших животных, знаменатель - количество животных в группе.

В приведенном примере DcL составила 500 млн микробных клеток, LD_{50} - 125 млн микробных клеток. Однако, в большинстве случаев, результаты опытов не дают однозначного ответа о величине LD_{50} и требуется ее вычисления по формуле ***Кербека:*** $IgLd_{50} = Ig\ Dn - S\ (\Sigma\ Li - 0{,}5)$, в которой S - логарифм отношений каждой последующей дозы к предыдущей; Li - отношение числа погибших животных к их общему числу в группе; Σ Li - сумма значений Li, найденная для всех доз; D_N - максимальная из испытанных доз.

Культуры, выращенные на жидких питательных средах, разводят в то или иное количество раз.

Минимальная смертельная доза может резко варьировать в зависимости от вида и штамма микроба, а также вида животного, места введения и других факторов. Например, для определения вирулентности возбудителя пастереллеза - 18-часовую агаровую культуру бактерии P.multocida смывают физиологическим раствором и устанавливают содержание микробов по оптическому стандарту до 1 млрд. в 1 мл.

Определение LD50. Этот метод определения вирулентности микробов более достоверный и менее зависит от индивидуальной чувствительности животного.

Из культуры бактерий или вирусов делают десятикратные разведения. Каждое разведение вводят нескольким животным.

Очень трудно подобрать такое разведение, которое вызывало бы гибель 50% животных, поэтому в настоящее время применяется метод статистического учета и исчисления LD_{50}, предложенный Л.Ридом и Х.Менчем.

При исследовании материала, разведенного от 10^{-1} до 10^{-8}, потребуется 8 групп животных. После прекращения наблюдения отмечают количество погибших животных в каждой группе и определяют LD_{50} при помощи специальных таблиц.

Проведение дермонекротической пробы.

Она применяется для выявления некротоксина, содержащегося в фильтрате бульонной культуры.

Для этого у кролика белой масти на боковой поверхности выбривают участок кожи и дезинфицируют, внутрикожно вводят 0,2 мл исследуемого материала. При положительной пробе вначале отмечают гиперемию, затем отек и в последнюю очередь некроз (обычно через 2 – 3 дня).

Контрольные вопросы:

1. С какой целью проводят заражение лабораторных животных?
2. Какие виды лабораторных животных используют для экспериментального заражения?
3. Какие методы используют для заражения животных?
4. В каких условных единицах измеряют вирулентность микроорганизмов?
5. Раскрыть сущность метода бактериологического исследования трупа животного.

Раздел II. Общая вирусология

2.1 Правила работы в вирусологической лаборатории

Цель занятия. Ознакомить с режимом работы в вирусологической лаборатории, с техникой безопасности при работе с вируссодержащим материалом.

Задание:

1. Усвоить основные правила техники безопасности.
2. Приобрести навыки в подготовке лабораторной посуды и материала для вирусологических исследований

Материальное оснащение: настольный бокс, люминесцентный микроскоп, центрифуга, холодильники, магнитные мешалки, термостаты, спиртовки, стеклянная посуда (груши, пробирки под резиновыми пробками, флаконы, пробирки, матрасы, чашки Петри, пипетки). Журнал регистрации студентов, получивших инструктаж по технике безопасности при работе в вирусологической лаборатории; документация лаборатории и основные утвержденные инструкции по правилам работы в ветеринарных учреждениях.

Вирусологическая лаборатория предназначена для выполнения научно-исследовательской, производственной или учебной работы. Лаборатория имеет 5-6 комнат: приемная, где регистрируется патологический материал; комната - где проводится предварительная обработка материала; комната – для проведения вирусологических исследований, где имеются боксы. Комнаты-боксы должны быть хорошо освещены, оборудованы бактерицидными лампами. Комната – автоклавная, для стерилизации посуды, обезвреживания заразного материала. Моечная комната - для мытья посуды, аппаратуры, приборов. Виварий - помещение для содержания лабораторных животных.

При работе с вируссодержащим материалом необходимо выполнять *следующие требования:*

- не допускать рассеивания вирусов во внешней среде;
- предотвратить контаминацию вируссодержащего материала посторонней микрофлорой;
- обеспечить личную безопасность.

Для выполнения этих требований следует соблюдать следующие *правила работы:* необходимо быть очень внимательным, собранным и аккуратным, входить в помещение лаборатории и выходить из него только в халате, переодеваясь в гардеробе, работать в халате и марлевой маске, на рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов, запрещается курить и принимать пищу. Пользоваться только стерильными инструментами и посудой, открывать и закрывать сосуды у пламени горелки, не брать пипеток в рот, отработанные инструменты складывать в стерилизатор для последующего обезвреживания и кипячения. Отработанные пипетки собирать в сосуд с дезинфицирующим раствором, твердые и жидкие отходы собирать в специально приспособленные контейнеры для последующей стерилизации.

Запрещается выливать или сбрасывать отходы в унитазы и раковины.

До и после работы рабочее место дезинфицируют.

В вирусологической лаборатории должна быть *документация:*

1 Инвентарная книга музейных штаммов вирусов.
2 Журнал учета движения вируссодержащего материала в лаборатории.
3 Журнал учета движения вируссодержащего материала в лаборатории.
4 Журнал учета зараженных подопытных животных.
5 Журнал учета выделяемых вирусов.

Лабораторная посуда должна быть чистой и стерильной. Моют ершами, мылом, порошком и содой, промывают в проточной воде, споласкивают дистиллированной водой, затем сушат в сушильных шкафах или в комнате, сухая посуда заворачивается в пергаментную бумагу и стерилизуется автоклавированием.

Основные методы лабораторной диагностики вирусных заболеваний

В основе лабораторной диагностики вирусных инфекций лежат 3 группы методов:

1 группа - Обнаружение вируса или его компонентов непосредственно в клиническом материале, взятом от больного, и получение ответа через несколько часов (быстрая; экспресс-диагностика). Методы экспресс-диагностики наиболее распространённых вирусных инфекций:

- электронная микроскопия,

2 группа методов - Выделение вируса из клинического материала, его индикация и идентификация (вирусологическая диагностика). Эта группа методов требует продолжительного времени, трудоёмка, часто является ретроспективной.

3 группа методов - Серологическая диагностика вирусных инфекций.

Однократно проведенное серологическое исследование лишь в редких случаях позволяет диагностировать вирусное заболевание (например, при ВИЧ-инфекции). В большинстве случаев для серологической диагностики требуются парные сыворотки, взятые в острой фазе заболевания и спустя 2-4 недели. Обнаружение четырёхкратного и более повышения титра антител принято рассматривать в качестве диагностического признака острой вирусной инфекции.

Рассмотрим основные методы лабораторной диагностики инфекционных болезней вирусной этиологии *(вирозы):*

1. Вирусоскопический метод;
2. Собственно вирусолоическая диагностика;
3. Биологический метод;
4. Серологический метод;
5. Молекулярно-генетический метод.

I. Вирусоскопический метод

Изучение вирусов с помощью микроскопа. В вирусологии в основном применяют следующие *виды микросокпии*: оптическая (световая), электронная и люминесцентная.

С помощью гистологических методов обнаружение внутриклеточных телец-включений (например, тельца Бабеша-Негри – при бешенстве, тельца Пашена – при оспе, и т.д.)

РИФ (реакция иммунофлюоресценции) – люминисцентная микроскопия.

II. Собственно вирусологический метод

Этот метод включает культивирование и накопление вируса, для этого в вирусологической практике используют куриные эмбрионы, культуры клеток и лабораторных животных.

Исследование проводят в 2 этапа:

- **индикация вируса,** т.е. обнаружение вируса в материале;
- **идентификация вируса,** т.е. определение типа и вида вируса.

Индикацию проводят:

- по обнаружению специфических изменений в курином эмбрионе;
- по феномену гемагглютинации;
- по цитопатогенному действию (ЦПД) вируса на клетку;
- по образованию специфических включений в клетке;
- по феномену гемадсорбции.

И*дентификацию* вирусов проводят с помощью специфических иммунологических реакций: РН – реакция нейтрализации, РГА – реакция гемагглютинации, РСК – реакция связывания комплимента и т.д.

III. Биологический метод

Биопроба – основан на использовании для постановки эксперимента (опыта) чувствительных лабораторных животных. Животных применяют для культивирования, индикации и идентификации вирусов.

IV. Серологический метод

Серологическая диагностика основана на иммунологических реакциях. С помощью них в сыворотке крови больного животного обнаруживают специфические противовирусные антитела. В вирусологии чаще применяют ИФА (иммуноферментный анализ), РГАд, РТГА (реакция торможения геммаглютинации) и другие.

V. Молекулярно-генетический метод

Один из специфичных методов. Для обнаружения в биоматериале фрагмент генома вируса применяют – ПЦР (полимеразная цепная реакция), ДНК-гибридизация и другие.

Контрольные вопросы:

1. Правила безопасности при работе с вируссодержащим материалом.
2. Устройство вирусологической лаборатории.
3. Методы диагностики вирусных инфекций.

2.2 Морфология и химический состав вирусов

Цель занятия. Ознакомить обучающихся со строением вириона вируса и его химическим составом.

Задание:

1. Знать виды симметрии и формы вирусов.
2. Знать отличие простого и сложного вируса.

Вирусы строгие внутриклеточные паразиты животных, человека, растений, насекомых, бактерий, грибов, простейших и других живых существ.

Вирусы – ультрамикроскопические неклеточные формы жизни, облигатные внутриклеточные паразиты живого организма (рис. 37).

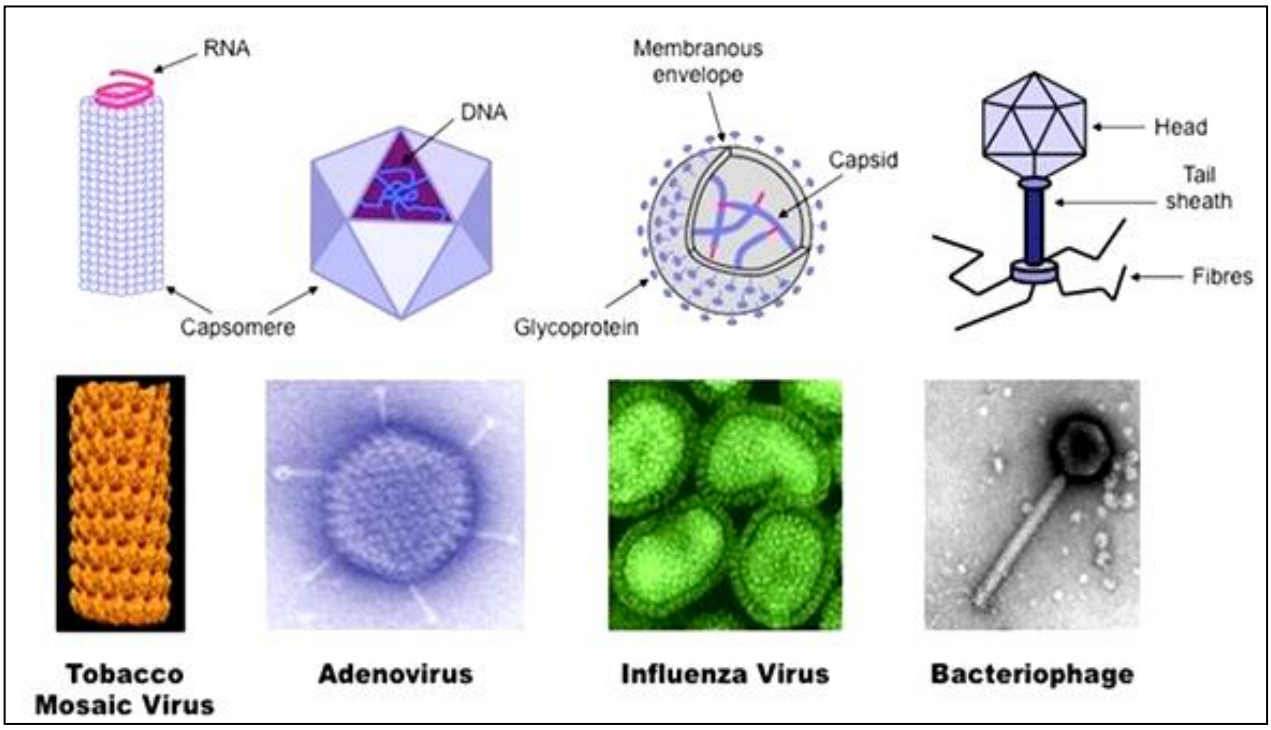


Рисунок 37 – Морфологическое разнообразие вирусов

В природе вирус существует **в виде**:

1) Вирион - внеклеточная или покоящаяся форма.
2) Внутриклеточная, размножающаяся (репродуцирующаяся) форма. Синоним - «комплекс вирус - клетка».
3) Провирус - геном вируса, является частицей клеточного генома.
4) ДИ - частицы — дефектные интерферирующие частицы, утратившие участок родительского генома (мутанты вирусов).

У вирусов наблюдается большое разнообразие форм и биологических свойств, однако все они имеют общие черты строения. Зрелые частицы вирусов называют вирионами.

По **форме различают** вирионы — сферические (округлые), икосаэдрические (20-гранник), палочковидные, овальные, нитевидные, сперматозоидные (рис. 38).

Все вирусы подразделяются на поражающие человека, животных, насекомых, бактерии и растения.

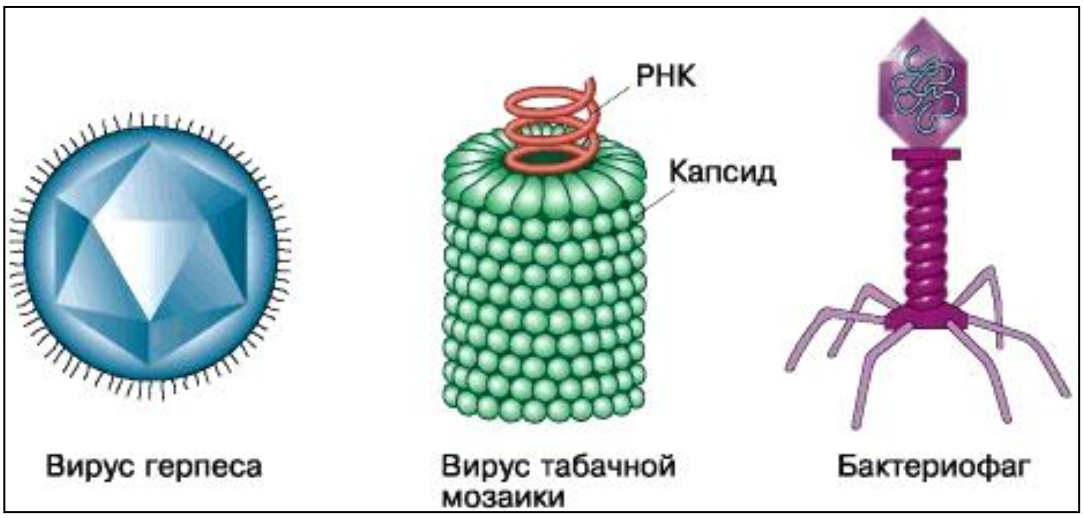


Рисунок 38 – Формы вирионов (кубическая, палочковидная, сперматозоидная)

Строение/морфология вирусов

простой вирус (рис. 39)

сложный вирус (рис.40)

Простые вирусы – в строении вириона выделяют **геном (1)** – представлен одним типом нуклеиновой кислоты (либо ДНК, либо РНК), который сверху покрыт белковой оболочкой, называемой – **капсид (2)** (*от греч. capsa – футляр*). Капсиды вирионов образованы белковыми субъединицами, уложенными строго определенным образом, называемые **– капсомерами (3).** Нуклеиновую кислоту и капсид называют - **нуклеокапсид (4)** (рис. 39).

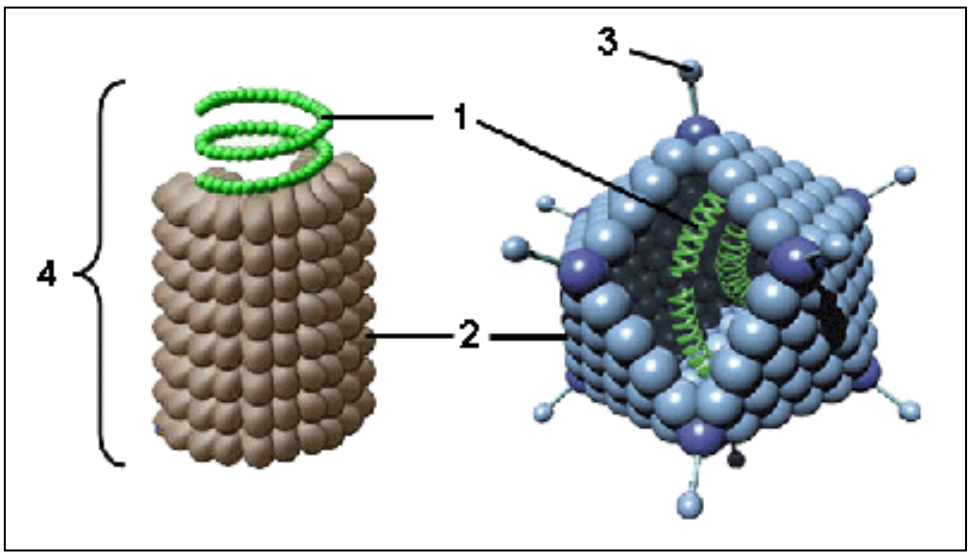


Рисунок 39 – Строение простого вируса

Капсид - выполняет ***защитную функцию***. Он защищает нуклеиновую кислоту вируса от различных физических и химических воздействий, в первую очередь от действия многочисленных нуклеаз.

Вторая функция капсида заключается в наличии в его составе рецептора, соответствующего рецептору заражаемой клетки. Иначе говоря, капсид определяет адсорбцию вируса на поверхности клетки хозяина.

В процессе эволюции сложилась ***уникальная избирательность вирусов*** - поражать строго определенный круг хозяев, а в организме хозяина — определенный тип клеток. Это явление носит название – **тропизм вируса.**

Сложный вирус – в структуре вириона также имеется 1 тип нуклеиновой кислоты покрытой капсидом. Особенностью в строении является наличие второй оболочки - липопротеидный верхний чехол – **суперкапсид или пеплос**. Он представлен двойным слоем липидов, в который погружены молекулы специфических белков. У некоторых вирусов от суперкапсида выступают отростки называемые **пепломеры**. В стурктуре вирусов есть также ферменты (рис. 40).

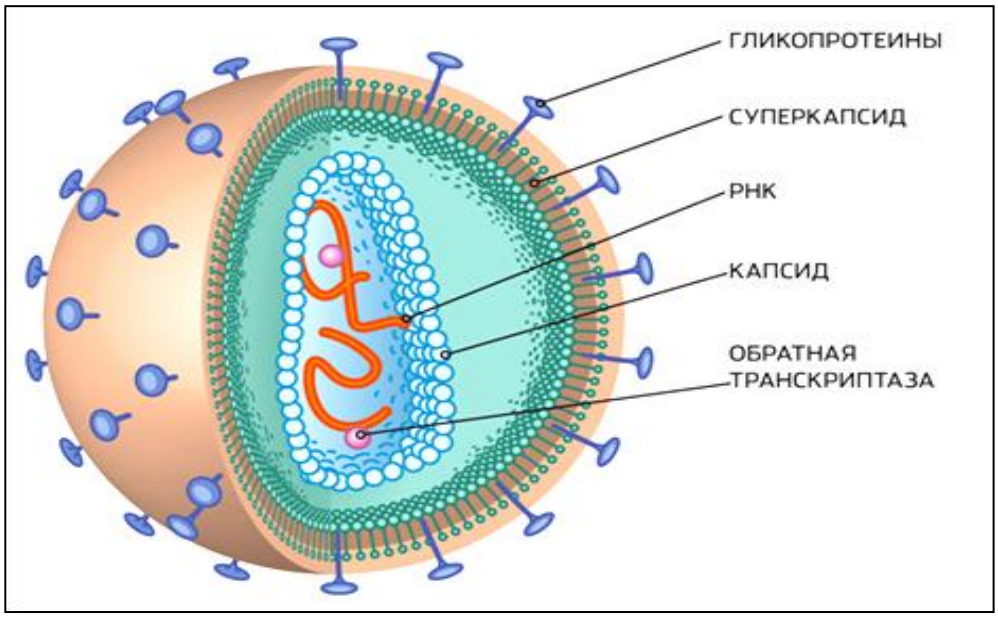


Рисунок 40 – Строение сложного вируса

В зависимости от расположения капсомеров различают **3 типа симметрии** капсида вирусов: *спиральная, кубическая, смешенная*.

При спиральной симметрии капсомеры располагаются по спирали (вдоль спирали нуклиновой кислоты) и взаимодействуют с нуклеиновой кислотой вируса. Для высвобождения НК необходимо разрушить весь капсид.

Спиральная симметрия капсида наблюдается у вирусов растений, у РНК - содержащих вирусов семейства коронавирус, ортомиксвирус, парамиксовирус, рабдовирусов и д.р.

Кубическая симметрия наблюдается у ДНК-содержащих вирусов (аденовирусы, герпесвирус, паповавирус, парвовирусов), некоторых РНК-содержащих вирусов (пикорнавирусы, тогавирусов и др.)

При кубической симметрии у вирусов с икосаэдрической формой капсомеры располагаются на вершинах, на ребрах, на гранях, треугольников по два (димер), по три (тример), по пять (пентамер), по шесть (гексамер). При

таком расположении капсомеров взаимодействия их с НК не наблюдается. Каждый капсомер у различных вирусов состоит из определенного количества химических, морфологических единиц. Поэтому размер капсомеров у вирусов будет различным.

Количество капсомеров у вирусов является видовым признаком. Например, у вируса герпеса - 162 капсомера.

Вирусы по размеру делят на **3 группы**: крупные, средние, мелкие вирусы.

Крупные вирусы - имеют размер 150-450 нм. К ним относят поксивирусы и герпесвирусы.

Средние вирусы - имеют размер 100-150 нм. Это отромиксовирусы, рабдовирусы, коронавирусы и другие.

Мелкие вирусы (парво-, пикорна-вирусы) имеют размеры 20-40 нм.

Молекулярная масса вирионов измеряется **в дальтонах (Д).**

1 Д - масса 1 атома водорода - 1,67 г.
1000 Д - 1 килодальтон (КД).
1000000 Д - 1 мегадальтон (МД).

Химический состав вирусов

Простые (голые) вирусы состоят из нуклеиновой кислоты и *белкового чехла* - капсида. Структурной единицей капсида является - капсомер.

Сложные вирусы кроме нуклеокапсида имеют суперкапсид (или пеплос) - это наружная *липопротеидная оболочка*, в состав которой входят *белки, липиды, углеводы*. Сложные белки капсида и суперкапсида обладают антигенными свойствами.

Генетическая информация о кодируемых полипептидах вируса заложена в геноме вируса (его нуклеиновая кислота).

В отличии от всех живых существ в природе вирусы имеют только одну нуклеиновую кислоту; или ДНК или РНК.

Особенности ДНК и РНК вирусов в том, что ни имеют различные их структуры: линейные одно- и двунитчатые формы ДНК/РНК, и бывают фрагментированные, кольцевые. Геном мелких простых вирусов представлен несколькими генами, которые кодируют несколько белков. Геном крупных сложных вирусов может иметь сотни генов, которые кодируют большое количество полипептидов (белков структурных и неструктурных).

Неструктурные белки - ферменты принимают участие в белковом, нуклеиновом и углеводном обменах, во всех стадиях репродукции (размножении) вирусов. *Ферменты у вирусов различают*:

1. Вирус-специфические - входят в состав вирусов (ДНК-полимераза, РНК-полимераза, транскриптаза, обратная транскриптаза).

2. Вирус-индуцируемые - синтезируются в зараженной клетке после проникновения вируса.

Белки вирусов различны по химическому составу и следовательно, по функциям. Многообразие белков определяется количеством и последовательностью расположения аминокислот. Белки построены из 20-ти аминокислот и являются полимерами, где мономером будет аминокислота.

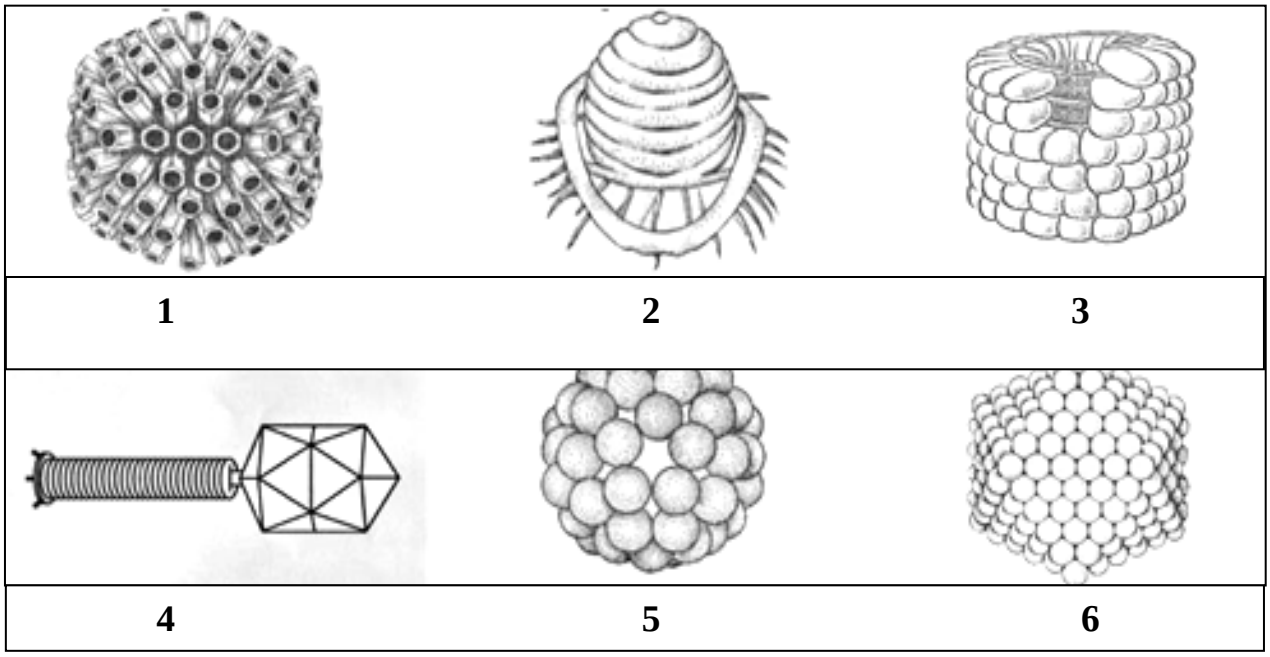
В белках различают виды связей: *пептидные* ($CO\text{-}NH_2$), между аминокислотами (боковые цепи не участвуют); *водородные связи* между атомами водорода и кислорода (непрочная связь); *дисульфидные связи* между атомами серы. Отсюда и различают белки первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры.

ДНК и РНК вирусов также являются ***полимерами,*** где мономером является нуклеотид. При синтезе нитей ДНК и РНК каждый последующий нуклеотид пристраивается (пришивается) ферментами.

Химическое исследование ДНК в клетках различного происхождения выявило следующие закономерности, что количество А=Т, Г=Ц.

Установлено комплементарное расположение азотистых оснований в двух нитях ДНК. Эти открытия, а также полученные английскими учеными (М.Уилкинс, Р.Франклин) рентгенограммы ДНК, способствовали расшифровке структуры ДНК учеными Д.Уотсоном и Ф.Криком. Уотсон и Крик не только расшифровали структуру ДНК (двойная спираль), но и предложили схему ее репликации(воспроизведения), передачи наследственных признаков потомству.

Задание для самостоятельной работы студента: Зарисовать простые и сложные вирусы. Рассмотреть физическую структуру вирусов. Определить форму вирионов на рисунке:



Контрольные вопросы:

1 Формы существования вирусов.
2 Виды исмметрии капсида.
3 Строение простого и сложного вируса.
4 Единицы измерения вирусов.
5 Основные химические элементы вириона.
6 Ферменты вирусов, их функци.

2.3 Подготовка вируссодержащего материала для исследования

Цель занятия. Ознакомить с техникой взятия и подготовки патологического материала, правилам безопасности при работе с вируссодержащим материалом.

Задание:

1. Усвоить требования в взятию, транспортировке, хранения и подготовки материала для вирусологических исследований.
2. Приобрести навыки подготовки лабораторной посуды для вирусологических исследований.

Диагноз на вирусные инфекции очень часто необходимо *подтвердить*, уточнить в лаборатории *вирусологическими исследованиями*.

Для этого, необходимо уметь правильно отбирать патологический материал для исследований. Материал от заболевших, павших или вынужденно убитых животных следует брать как можно быстрее после появления четких признаков болезни или не позднее 2-3 часа после клинической смерти или убоя. Это связано с тем, что сразу после заболевания или впервые 1-2 дня – значительно ослабевает барьерная роль кишечника, что наряду с повышенной проницаемостью кровеносных сосудов способствует диссеминации/ распространению кишечной флоры.

При взятии материала для выделения вируса следует исходить из патогенеза изучаемой инфекции. Так, при респираторных инфекциях берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки, соскобы трахеи и кусочки легкого трупов; при энтеровирусных - кал; при нейротропных - кусочки головного или спинного мозга; при дермотропных инфекциях - свежие поражения кожи и т.д., т.е. отбирают тот материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса.

Материалом для выделения вируса могут служить различные экскреты и секреты, экссудат, кусочки органов, кровь, лимфа и пр.

Смывы с конъюнктивы, со слизистой оболочки носа, с задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут *стерильными ватными тампонами* и погружают их в пенициллиновые флаконы или пробирки, содержащие 3-5 мл раствора Хенкса или среды для культур клеток с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД и нистатин по 20 ЕД на 1 мл среды) и белковым стабилизатором, например 0,5 % раствором желатина или 0,5-1 % раствором альбумина бычьей сыворотки.

При взятии материала из носоглотки можно пользоваться *прибором, сконструированным Томасом и Стоком.* Он состоит из трубки диаметром 9 мм и длиной 30 см, внутри которой помещается вторая тонкая трубка с нержавеющим стержнем, оканчивающимся нейлоновой щеткой. Прибор вводят глубоко в носовые ходы или в горло через носовой ход, выдвигая щеточку, а затем, вновь задвигая ее в трубку, перед тем как вынуть прибор из органа. Щеточку тщательно отмывают от слизи и клеток в 2 мл жидкости.

Слюну имеет смысл брать при наличии признаков поражения ротовой полости или слюнных желез. Вытекающую изо рта слюну можно собирать прямо в пробирку и закрыть резиновой пробкой.

Мочу собирают при помощи катетера в стерильную посуду.

Фекалии берут из прямой кишки шпателем или палочкой и помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон.

Везикулярную жидкость можно собрать шприцем или пастеровской пипеткой в стерильную пробирку.

Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом.

Спинномозговую жидкость используют редко. Ее берут асептично путем обычной пункции.

Пробы должны быть по 10-20г. в стерильные флаконы или пробирки с этикеткой, где указывается вид животного, номер животного, орган.

В сопроводительном документе указывается название хозяйства, фермы, клинические признаки у больных животных, предварительный диагноз.

Патологический материал доставляют в лабораторию срочно, чтобы сохранить вирус в активном состоянии. С этой целью материал консервируют путем охлаждения, замораживания в термосе, в растворе глицерина.

В лаборатории полученный материал освобождают от консерванта, оттаивают, отмывают от глицерина, взвешивают. Часть материала берут для вирусологических исследований, оставшуюся часть хранят в холодильнике на случай дополнительных исследований.

Вирус необходимо высвободить из клеток органов и тканей. Для этого материал тщательно измельчают ножницами и растирают со стерильным кварцевым песком до получения кашицеобразной массы. Добавляют 1:10 стерильный физиологический раствор, переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин. Надосадочная жидкость после проверки на бактериологическую загрязненность является материалом для вирусологических исследований. Ее отсасывают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры, обрабатывая антибиотиками широкого спектра действия (пенициллин, стрептомицин, нистатин, тетрациклин и т.д.). Дозы антибиотиков от 100 до 1-2 тыс. ЕД и более на 1 мл в зависимости от характера исследуемого материала.

Экспозиция суспензии с антабиотиками не менее 30-60 мин при комнатной температуре, затем материал подвергают бактериологическому контролю на наличие бактерий, грибов путем посева на МПА, МПБ, МППБ. После получения отрицательного результата вируссодержащий материал используют для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток. В случае положительного контроля суспензию вируса подвергают дополнительной обработке антибиотиками и повторно ставят контроль. Суспензию хранят при минус 20-70°С.

Контрольные вопросы:

1 Техника взятия патологического материала от больных животных.

2 Техника взятия патологического материала от трупов или забитых животных.

3 Сохранение вируса в материале и доставка его в лабораторию.
4 Как не допустить контаминации патологического материала посторонней микрофлорой?

2.4 Морфологические методы индикации вирусов в патологическом материале

Цель занятия. Ознакомить с основными методами индикации вирусов в патологическом материале путем обнаружения вирусных телец-включений и вирионов при диагностике вирусных инфекции.

Задание:

1. Изучить морфологические методы индикации обнаружения в материале специфических телец-включений.

2. Усвоить природу вирусных телец-включений и их роль в диагностике вирусных болезней.

Материальное оснащение: гистологические препараты, содержащие цитоплазматические тельца-включения; окрашенные препараты, содержащие внутриядерные тельца-включения, мазки оспенных везикул (или фолликул), окрашенные по Морозову; микроскопы с осветителями; иммерсионное масло, электронные микрофотографии вирионов разных вирусов.

Морфологическая методы индикации вирусных ифекций основаны на световой, электронной и люминесцентной микроскопии.

Из-за малой разрешающей способности светового микроскопа применение его в вирусологических исследованиях ограничено.

Используют **световую микроскопию** в следующих **случаях:**
1. Для обнаружения в клетках вирусных телец-включений;
2. Для обнаружения в препаратах крупных вирионов;
3. Для изучения цитопатогенного действия вируса на культуру клеток.

1. Обнаружение в клетках вирусных телец-включений

При репродукции многих вирусов в клетках образуются внутриклеточные вирусные ***тельца-включения***. Они могут быть *цитоплазматическими* (РНК-вирусы) и *внутриядерными* (ДНК-вирусы).

По природе происхождения тельца-включения могут представлять собой:
- скопление многих тысяч вирионов, оставшихся в клетке; или
- клеточный материал, изменившийся под действием репродукции вирионов;
- избыток вирусных белков, не вошедших в состав вирионов;
- комбинация этих элементов.

Размер телец-включений - едва заметны от размеров клеточного ядра, а *количество* колеблется от 1-2 до 10-12 штук на одну клетку.

Тельца-включения, образуемые в клетках некоторыми вирусами, получили специальные названия. Например, тельца-включения, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток, называются *тельцами Бабеша-Негри*, тельца, образуемые в цитоплазме эпителиальных клеток вирусами оспы птиц –

тельцами Боллингера, а оспы млекопитающих - *тельцами Гварниери*, вирусом чумы плотоядных – *тельцами Лентца*, вирусом инфекционного ларинготрахеита кур - *тельцами Зейфрида*.

Как правило, РНК-содержащие вирусы, образуют цитоплазматические, а ДНК-содержащие - внутриядерные тельца-включения.

Способность к окраске теми или иными красителями, размеры, форма, структура и местоположение в клетке телец-включений, образованных разными вирусами, разные, но *специфичные для каждого вируса*. Поэтому обнаружение в материале от больных животных внутриклеточных телец-включений с определенными характеристиками позволяет судить о том, каким вирусом они образованы, а значит и о присутствии этого вируса в исследуемом материале.

Для обнаружения телец-включений готовят мазки или отпечатки (посмертно или прижизненно), которые подвергают специальным методам окраски с последующей микроскопией. Для телец-включений, образуемых разными вирусами, методы окраски различны (рис. 41).

Например, при диагностике бешенства из всех отделов головного мозга погибших или умерщвленных животных, готовят препараты и окрашивают по Муромцеву. В положительных случаях обнаруживают тельца Бабеша-Негри. Они резко очерчены, фиолетового цвета с розовым оттенком, с хорошо выраженной дольчатостью, фон и цитоплазма клеток бледно-голубые, ядра синие, эритроциты оранжево-красные. Для окраски препаратов можно использовать также методы Селлерса, Туревича, Манна и др.

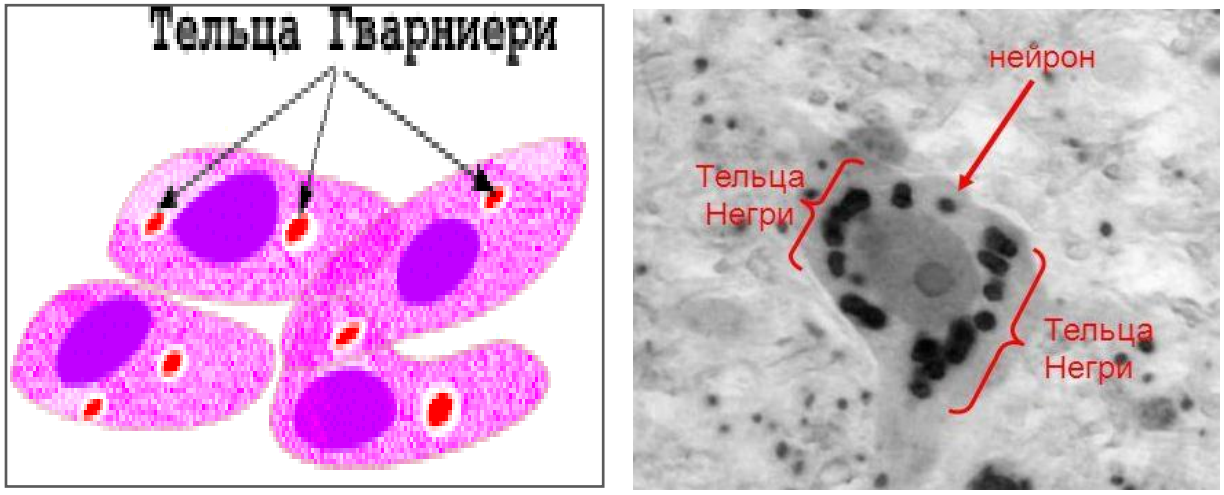


Рисунок 41 – Внутриклеточные вирусные тельца-включения

2 Обнаружение в препаратах крупных вирионов

С помощью светового микроскопа могут быть обнаружены только *крупные вирусы*, размеры которых превышают 200-350 нм. С этой целью используют специальные методы окраски, позволяющие искусственно увеличивать вирусную частицу и повысить контрастность микрокартины. Лучшим методом является окраска препарата *аммиачным серебром по Морозову*.

Только вирионы оспенных вирусов удается увидеть в световой микроскоп, поскольку они являются гигантами среди вирионов других вирусов, достигают

в размере 300-400 нм. Метод обнаружения вирионов оспенных вирусов с помощью световой микроскопии называется вирусоскопией. Препараты готовят из оспенных поражений кожи. В положительном случае на желтом фоне обнаруживают очень мелкие округло-овальной формы темно-коричневые тельца, лежащие группами, рядами или скоплением, но не одиночно.

3 Изучение цитопатогенного действия вируса на культуру клеток

Характеристика данного метода индикации вирусных телец-включений показан в ***пункте 2.10*** данного учебного пособия.

Бақылау сұрақтар:

1. Основные методы микроскопии вирусных инфекций.
2. Что такое вирусные тельца-включения?
3. Обнаружение вирионов в патологическом материале методом световой микроскопии.
4. Какие бывают вирусные тельца?

2.5 Электронно-микроскопическое исследование вирусов

Цель занятия. Ознакомиться с устройством микроскопа, основными принципами работы электронного микроскопа и техникой приготовления препаратов

Открытие электронов, их волновой природы, способности отклонятся от своего первоначального движения при прохождении через магнитные и электростатические поля позволило создать электронный микроскоп (рис. 42).

Электронная микроскопия позволяет изучить морфологию вирусов (строение, формы) на молекулярном и субмолекулярном уровне, морфогенез вирусов, изменения, вызываемые ими в пораженной клетке.

В этой связи, электронная микроскопия *является одним из важных методов идентификации* вирусов в диагностике вирусных инфекций, и является экспресс-методом диагностики.

Показателем качественной характеристики любого микроскопа является его полезное увеличение, т.е. разрешающая способность - это наименьшее расстояние между точками, которое воспринимается раздельно. Теоретически считается, что разрешающая способность микроскопа составляет примерно половину длины волны луча. Длина волны электронов составляет от 0,055-0,039 А° и разрешение микроскопа должно быть 0,02 А° (это теоретически, на самом деле в электронных микроскопах до 8А°).

В колонне электронного микроскопа воздух удаляется *двумя насосами*: механическим и диффузионным. Вначале создается предварительный вакуум (10 мм рт. ст.), затем создается давление до 10 мм рт. ст. В электронном микроскопе используются магнитные линзы. *Магнитные линзы* - это магнитное поле, которое создается проволочной катушкой при пропускании тока. Электроны в магнитном поле двигаются не прямо, а по спирали.

Рисунок 42 – Виды электронных микроскопов

В электронном микроскопе пучок электронов испускается катодом (вольфрамовой нитью) и устремляется вниз по колонне, фокусируется конденсорной линзой на объект.

В результате различной электронной плотности частей объекта происходит рассеивание электронов из их общего электронного луча и однородность их изменяется. Этот измененный электронный луч фокусируется и увеличивается второй раз объективной линзой. Затем изображение еще раз увеличивается магнитной проекционной линзой и попадает на люминесцентный экран.

Контрольные вопросы:

1 Значение электронной микроскопии в вирусологии.
2 Разрешающая способность электронных микроскопов.
3 Принцип работы электронного микроскопа.

2.6 Лабораторные животные, и применение их в вирусологии

Цель занятия. Изучить способы фиксации, маркировки, техники взятия крови у различных лабораторных животных, также способы заражения лабораторных животных.

Задание:

1. Освоить технику фиксации и маркировки животных.
2. Освоить получение компонентов крови.
3. Отработать способы заражения лабораторных животных.

Материальное оснащение: кролики, морские свинки, белые мыши, ножницы, стерильные шприцы с иглами, спирт, ватные тампоны, подставки для животных, краски, стерильные пастеровские пипетки, чистые пробирки,

центрифужные пробирки, лимонно-кислый натрий, колбочки со стеклянными бусами, центрифуга.

Лабораторные животные это различные виды животных, специально разводимые в питомниках или в условиях лаборатории для экспериментальных целей. Лабораторные животные используются в целях диагностики инфекционных болезней. Моделирования различных патологических состояний, изучения лечебно-профилактических препаратов, диагностических препаратов- сывороток, вакцин, культур клеток и др. Всего в биологических исследованиях используют до 250 видов животных. Лабораторных животных делят на беспозвоночные и позвоночные. Позвоночные лабораторные животные с познавательной целью изучались с древнейших времен, первоначально эксперименты проводились на домашних животных. В IV веке стали известны белые мыши, крысы и морские свинки. Но понятие лабораторные животные - сложилось к концу XIX века. Из всех лабораторных животных более широко в вирусологических исследованиях используют: белых мышей, морских свинок, кроликов, хомяков, собак, обезьян, цыплят. Но выбор того или иного животного зависит от вида применяемого вируса. Продолжительность жизни лабораторных животных разная. Так, белые мыши живут 1,5 - 2года, крысы - 2-2,5 года, морские свинки - 6-8 лет, кролики - 4-9 лет (рис. 43).

При изоляции (выделении) вируса из патологического материала в вирусологической практике проводится не менее трех слепых пассажей, на лабораторных животных - делается биопроба. После проводят идентификацию выделенного вируса, при помощи серологических реакций.

Цель применения лабораторных животных в вирусологии:

- Для обнаружения вируса – биопроба.
- Для выделения вируса и получения вируссодержащего материала от положительной биопробы.
- Для поддержания вируса в лаборатории, т.е. для сохранения его в активной форме в течение многих лет. Это достигается путем чередований пассажей и хранений в консервирующих условиях. **Пассаж** – заражение живого объекта с последующим получением новой популяции вируса.
- Для накопления вирусной массы с целью исследования вируса и получения вакцин.
- Для титрования вирусов.
- Как тест-объект в реакции нейтрализации.

У лабораторных животных после заражения отмечают:

1. Гибель в характерные для данного вируса сроки.
2. Характерные патологоанатомические изменения.
3. Характерные клинические признаки.

Цели вскрытия:

- обнаружить характерные для данной вирусной патологии изменения во внутренних органах.
- взять материал для последующих пассажей (материал берется в зависимости

от тропизма вируса).

а) белые мыши

б) золотистые хомячки

в) кролики

г) морские свинки

Рисунок 43 – Виды лабораторных животных

Содержание животных. Лабораторные животные содержатся ***в виварiях,*** где должны быть помещения для животных, моечные. Кухня для приготовления корма, кладовая помещение для обслуживающего персонала и др. помещения для животных должны быть светлые, с хорошей вентиляцией и исключительно чистые. При этом стены и полы должны быть легко дезинфицируемыми. Животных зараженных различными вирусами содержат отдельно. Посуда для воды и корма должна ежедневно дезинфицироваться 3% раствором хлорамина и после чего тщательно моют и ополаскивают. Помещения обрабатывают 1% раствором едкого натра.

В виварии должны соблюдаться зоогигиенические правила содержания и кормления животных и в каждом помещении должны быть термометр, гигрометр. В виварiях лабораторные животные содержатся в металлических клетках, стеклянных колбах, в клетках из искусственных материалов.

Кормление лабораторных животных. Для всех видов животных устанавливают суточные нормы белка, углеводов, витаминов, минеральных солей, микроэлементов. В последнее время используют сбалансированные корма в виде кормовых таблеток, гранул, которые можно точно дозировать,

занимают мало места и более дешевые.

Фиксация и маркировка.

Белую мышь берут рукой, корнцангом или анатомическим пинцетом за хвост, большим указательными пальцами ее фиксируют за кожу затылка.

Морские свинки очень ловкие и шустрые. Их ловят рукой, поглаживая спину, опускают руки к груди и затем удерживают головой вверх и другой рукой поддерживают заднюю часть тела.

Кролика держат за дорсальную часть шкуры и приподнимают к верху, поддерживая другой рукой заднюю часть тела. Взятый таким образом кролик не будет царапать (держать кролика за уши или ноги- значить мучить его). Можно кролика заворачивать в одеяло и так фиксировать его.

Курицу фиксируют руками: одной рукой держат ноги, дугой крылья.

Маркируют животных различными методами:

1) Цветная маркировка - наносят пятна или цифры красками (у мышей и крыс).
2) Татуировка уха (у кролика, собак).
3) Нумерование ушными бирками (у морских свинок, кроликов).
4) Выстригание шерсти (хомяков, обезьян).
5) Ампутация пальцев (у мышат) маленькими острыми ножницами отрезают пальцы.

Подготовка к опыту. Животные должны быть здоровыми, упитанными. Для опыта используют животных одинакового возраста, веса или одного пола. Молодые мышата более восприимчивы ко многим вирусам.

*По генетическим качествам л*абораторных животных можно разделить на **4 группы:**

1. *Животные смешанного происхождения* - это гетерогенные животные, полученные от разных животноводов.
2. *Выведенные животные* - полученные от одного источника, но генетически эти животные вариабельные.
3. *Инбредные линии* - это поголовье животных, которое возникло путем близкородственного спаривания: брат - сестра, родители - дети на протяжении 20 поколений. При этом методе разведения достигается высокая степень гомозиготности. Например, известны следующие линии мышей: инбредная линия мышей СЗН, которая высокочувствительна к вирусу рака молочной железы.
4. *Однородные гибриды* - эти мыши генетически однообразные, которые соответствуют степени гомозиготности родительских линий. Эти животные менее изменчивы, чем их родительские линии.

При вирусологических исследованиях на лабораторных животных необходимо учитывать, что лабораторные животные *могут быть скрытыми вирусоносителями* и при искусственном заражении эти латентные инфекции могут усиливаться. Кроме того, в результате перекрестного иммунитета могут быть ошибки при серологических исследованиях. В этой связи, при некоторых исследованиях следует использовать гнотобиотов.

Гнотобиот – это безмикробное, стерильное животное. Гнотобиты высокочувствительны к вирусной инфекции. Стерильные животные содержатся

в абсолютно стерильных помещениях, нет контакта с живыми микроорганизмами. Воздух, вода, корма должны быть совершенно стерильны. Среди гнотобиотов имеют значение животные, которые свободны только от патогенных микробов. Непатогенная микрофлора и вирусы находятся в организме таких животных. Эти животные в ряде стран, послужили ядром для создания племенных товарных фирм, свободных от инфекционных болезней.

В вирусологической практике лабораторные животные используются для различных исследований. Большинство вирусов разных таксономических групп могут быть от дифференцированы друг от друга на основе их патогенности для различных видов животных или для различных возрастных категорий одного вида животных.

Поэтому выбор животного и его возраст для заражения определяется вирусом, с которым мы работаем или который мы собираемся выделять. Из лабораторных животных в вирусологии наиболее часто используются: белые мыши, хомяки, крысы, кролики, морские свинки, цыплята. При изучении одной инфекции иногда используются животные различных видов, обладающие различной чувствительностью к данному вирусу, что помогает провести дифференциацию вирусов, вызывающих клинически сходную картину болезни (везикулярный стоматит, ящур, везикулярная болезнь свиней).

Подбор лабораторных животных. У всей группы однородных животных должны быть близкими исходные показатели (масса, возраст, физиологическое состояние, температура), поэтому животных в группу специально подбирают.

От правильности отбора животных зависит в значительной мере успех в выделении, титровании и пассировании вируса, в группу для заражения берут четное количество животных, чтоб можно было определить ID_{50} и LD_{50} (инфекционную дозу вируса, вызывающую инфекцию у 50% взятых в опыт животных, или летальная доза, вызывающая гибель 50% зараженных животных).

Методы заражения животных. Существует несколько способов заражения лабораторных животных. *Выбор способа заражения зависит от вида вируса и его тропизма.* Перед парентеральным заражением исследуемый материал обрабатывают; освобождают от консерванта (оттаивают и промывают), ткань измельчают ножницами, растирают в ступке с кварцевым песком. Из полученной массы готовят 10% суспензию на растворе Хенкса и центрифугируют 15 или 20 мин. при 1500 - 3000 оборотах в мин. надосадочную жидкость отсасывают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры, либо пропуская через бактериальные фильтры, либо обрабатывая антибиотиками широкого спектра действия (пенициллин, стрептомицин, нистатин и др.). Перед введением исследуемого материала в зависимости от способа заражения животным дают наркоз. Техника наркоза: животное сажают под колпак и кладут туда тампон, смоченный наркотическим веществом (эфир, хлороформ). После короткого периода возбуждения животное засыпает.

***Способы заражения лабораторных животных*:**

1. Оральное введение (per os - через рот). Материал примешивают к обычному корму или питьевой воде. Можно заражать через глоточный зонд,

который вводится через отверстие вставленного в рот кляпа или эластичный катетр, достигающий желудка.

2. Интроназальное введение (через нос). После наркотизации животного инфекционный материал вводят по каплям в ноздри при помощи тонкой капиллярной пипетки или круглой канюли. Для защиты от разбрасывания материала необходимо работать в маске и защитных очках.

3. Внутривенное введение. У мышей и крыс инъекции делают в хвостовую вену после погружения хвоста в теплую воду: у кролика - в ушную вену; у кур - в вену крыла; у морской свинки - в сердце. Перед введением на месте инъекции выстригают шерсть, обрабатывают ватным тампоном, смоченным в спирте или йодной настойке. Наполнение кровеносного сосуда осуществляют, зажав его рукой. Иглу вводят вдоль сосуда по току крови.

4. Интракардиальное введение (в сердце). Лабораторных животных фиксируют под наркозом на спине. Кур - в положении на боку. Место инъекции находится: у морской свинки - второе межреберное пространство в 2 мм от края грудной кости: у кролика - третье межреберное пространство по линии плечелопаточного сустава и каудального кольца грудной кости. Иглу вводят перпендикулярно к поверхности тела сквозь кожу до тех пор, пока не будет ощущаться пульсация сердца и пока в пространстве иглы не появится кровь. Инъекцию проводят медленно.

5. Интероцеребрально (в головной мозг). Инъекцию проводят сбоку от средней линии в середине между верхним краем глазной впадины и наружным слуховым проходом. До введения удаляют волосы со лба и дезинфицируют операционное поле. Иглу вводят на 2 мм (мышь), материал вводят медленно, маленькими дозами. После введения инъекции обрабатывают йодной настойкой или спиртом.

6. Интраперитонеальное введение (внутрибрюшинное). Животных фиксируют, поднимая за задние конечности вниз. При такой фиксации внутренние органы опускаются вниз. При этом образуется свободное место для иглы и уменьшается опасность повреждения отдельных участков кишечника. Место прокола находится между пукем и симфизом в стороне от средней линии (в паху). За зараженными животными устанавливают ежедневное наблюдение.

7. Подкожно – участок на спине.

8. Внутрикожно – чаще в пятку.

9. Внутримышечно – во внутреннюю поверхность бедра.

Исход заражения может быть различным:

а) животное погибает; б) животное переболевает, но не погибает.

В зависимости от исхода заражения исследование животных в дальнейшем проводят по-разному. Если животные погибли, то нужно из органов выделить чистый исходный вирус или обнаружить его или антиген вируса под микроскопом. Если животные переболели, но не погибли, нужно вирус или выделить или обнаружить к нему антитела в сыворотке крови переболевшего животного в серологических реакциях.

Заражение животных с диагностическими целями имеет недостатки:

Животные могут быть до опыта заражены и болеть латентно, то есть

отсутствие выраженных клинических симптомов, что может исказить полученные результаты.

Гнотобиоты также дороги и труднодоступны. Кроме, того после заражения вирус выделяют и идентифицируют применяя другие методы исследований, что усложняет работу.

Препарирование лабораторных животных (на примере белой мыши):

- Кожа смазывается дезинфектором.
- Производится разрез по linea alba / белой линии.
- Вскрытие грудины – берутся легкие и помещаются в колбу №1.
- Вскрытие брюшной полости – берутся печень, селезенка, почка и помещаются в колбу №2.
- Производится вскрытие черепной коробки. Берется головной мозг, делаются срезы 4-х слоев, кусочки помещаются на фильтровальную бумагу и делаются отпечатки на стекло.

Взятие крови и получение ее компонентов

У мышей, кровь берут из сердца, бедренной, хвостовой вены, ретробульбарного сплетения и аксиллярного пучка. Наиболее удобно взятие крови из ретробульбарного сплетения. Для этой цели наркотизированную белую мышь фиксируют между большим и указательным пальцами в области головы и плечевого пояса. Путем надавливания – на шею у животного создают задержку кровообращения в сосудах головы, следствие чего, глаза выпячиваются из орбиты. В медиальный угол глаза вводят капилляр пастеровской пипеткой и направляют ее в сторону гортани. При повреждении венозного сплетения кровь попадает в пипетку.

Взятие крови из аксиллярного пучка

Наркотизированную мышь зафиксировать в вертикальном положении большим **и** указательным пальцами в области шеи. Оттянуть переднюю лапку и сделать надрез кожи. В образовавшийся карман ввести капилляр пастеровской пипетки в направлении головы. В капилляр набирается кровь. Полученную кровь вносят в пробирки с раствором лимоннокислого натрия или в колбочку со стеклянными бусами. Дефибринируют.

У морских свинок кровь берут из сердца, наружной яремной вены. Из бедренной, ушной вен. Чаще всего берут кровь у морских свинок из сердца. Свинкуфиксируют в списанном положении. Помощник фиксирует руками задние и передние лапки животного, обрабатывают спиртом место пункции. Оператор пальцами левой руки нащупывает место нахождения сердца и правой рукой вводит иглу е сердце и осторожно оттягивая поршень шприца набирает 2-3 мл. крови.

У кроликов кровь берут из сердца, наружной яремной, ушной вены.

Взятие крови из ушной вены кролика

Помощник фиксирует кролика, обрабатывает место прокола спиртом и сдавливает ушную вену у основания уха. Оператор вводит иглу в вену или скальпелем прокалывает вену и собирает кровь. У кур- кровь берут из подкрыльцовой вены взятие крови из гребня осуществляется путем отрезания зубца.

Получение компонентов крови

Получение отмытых эритроцитов. Кровь дефибринируют, вносят в специальные пробирки и центрифугируют 5 мин. при 1000 оборотах. Затем надосадочнук жидкость удаляют, вносят физиологический раствор хлорида натрия, несколько раз перемешивают с эритороцитами, и центрифугируют 10 мин. при 1000 оборотах. Повторяют 3-4 раза до тех пор, пока физиологический раствор станет бесцветным. Надосадочную жидкость удаляют, а эритроциты используют для дальнейшей работы.

Получение сыворотки крови

Полученную от животных кровь вносят в чистую сухую пробирку и помещают в термостат на 20-30 минут, а затем обводят стеклянной палочкой от стенки пробирки и оставляют прохладном месте. Кровь сворачивается, над сгустком крови образуется сыворотка, ее отсасывают в чистую пробирку.

Самостоятельная работа обучающихся.

Подгруппа из 2-3 человек берут различных лабораторных животных, фиксируют, маркируют и по описанной выше методике берут кров и ее компоненты (получают эритроциты).

Берут по одной белой мыши, отработать технику - заразить подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, интрацеребрально и в хвостовую вену. Доза материала от 0,1 до 0,5 в зависимости от способа введения.

Контрольные вопросы:

1. Значение лабораторных животных в диагностике вирусных болезней.
2. Виды лабораторных животных.
3. Что такое виварий? Содержание животных.
4. Маркировка лабораторных животных.
5. По каким генетическим качествам отбирают лабораторных животных для вирусологических исследований?
6. Гнотобиоты, их значение в диагностике вирусных инфекций.
7. Техника взятия крови.
8. Цель заражения лабораторных животных, способы заражения

2.7 Куриные эмбрионы, их применение в вирусологии.

Цель занятия. Изучить современные методы индикации вирусов методом биопробы на куриных эмбрионах

Задание:

1. Знать строение 7-12 дневного куриного эмбриона, зарисовать.
2. Усвоить цель применения в вирусологии.
3. Знать основные методы культивирования вируса в курином эмбрионе.

Материальное оснащение: овоскоп, куриные эмбрионы, стерильные иглы для прокола скорлупы, иглы инъекционные, шприцы. Штативы для куриных эмбрионов. Пробирки с йодинированным спиртом. Спиртовки и исследуемый

материал. Парафиновые палочки, простые карандаши. Тампоны. Таблицы со схематическим изображением строения куриного эмбриона и методов заражения.

Куриный эмбрион (КЭ) – это зародыш куриного яйца, находящийся на разных стадиях эмбрионального развития.

Куриные эмбрионы как живая система вошла в вирусологию в 30-х годах XX века. В вирусологии используют чаще *5-7-дневные куриные эмбрионы, реже - 10-12-дневные.*

В курином эмбрионе способны размножаться большое количество различных вирусов. Это обусловлено тем, что куриный эмбрион содержит различные структуры, пригодные для размножения вирусов (рис. 44).

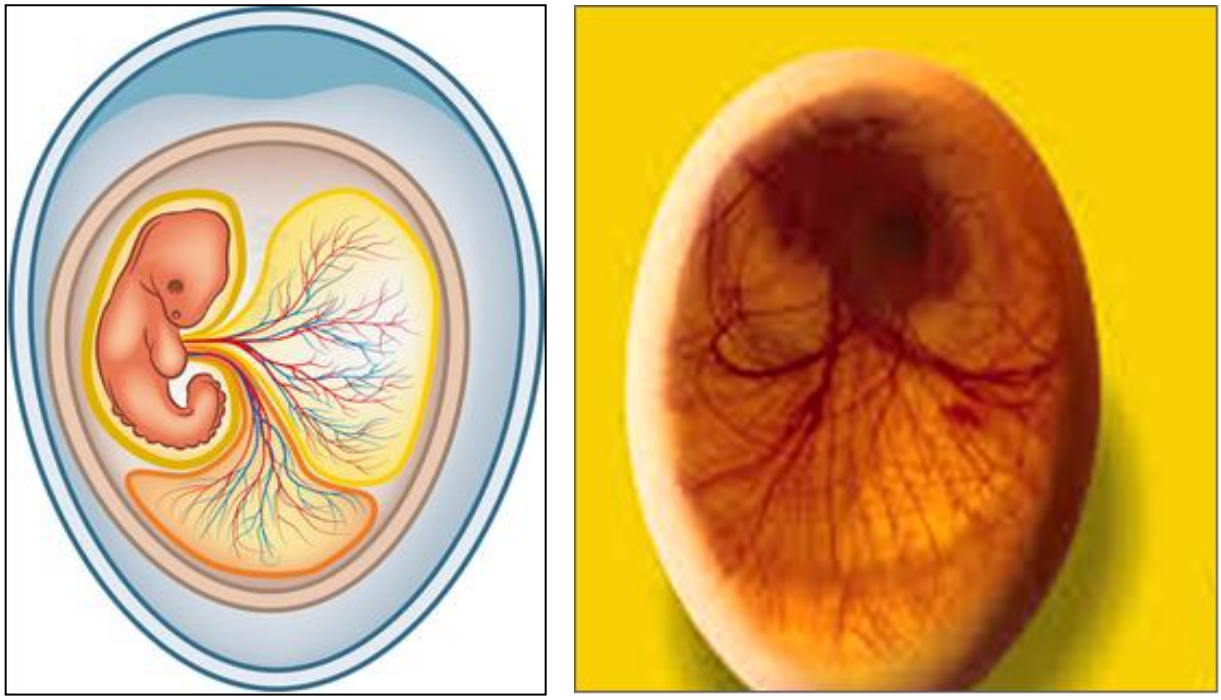


Рисунок 44 – Куриный эмбрион

Цели использования куриных эмбрионов. В вирусологии куриные эмбрионы используют:

1) для обнаружения в биологическом материале активного вируса биопробой;

2) для первичного выделения вируса и его культивирования;

3) для поддержания вирусов в лаборатории в активном состоянии;

4) титрования вирусов;

5) накопления большой массы вирусов для лабораторных исследований при производстве вакцин и диагностических тест-систем;

6) как тест-объект в реакции нейтрализации.

7) для получения культур клеток.

Преимущества куриного эмбриона перед лабораторными животными:

1. Высокая чувствительность к широкому спектру вирусов (это объясняется недостаточным развитием иммунной системы, не образуют антител в ответ на заражение, что обеспечивает высокую чувствительность эмбриона к вирусам).

2. Легкодоступный объект (большое количество птицефабрик и инкубаториев).

3. *Стерильность* (скорлупа и подскорлупная оболочка надежно защищают эмбрионы от бактериального заражения со стороны внешней среды). Однако *нельзя полностью* исключить содержание в них патогенных агентов (вирусного бронхита кур, гриппа, лейкоза, ньюкаслской болезни и др.).

4. Экономичны (низкая стоимость, т.к. не требуют ухода, кормления).

5. Простота постановки опыта (более простая техника заражения и получения вируссодержащего материла).

Требования, предъявляемые к куриным эмбрионам

При отборе куриных эмбрионов для заражения вируссодержащим материалом к ним предъявляют следующие требования:

1. Куриные эмбрионы должны быть *здоровыми*, и получены из благополучных по инфекционным заболеваниям птицеводческих хозяйств.

2. Скорлупа яиц должна быть *непигментированной, чистой* (мыть нельзя).

3. *Возраст эмбриона* должен соответствовать выбранному методу заражения.

4. *Жизнеспособность эмбриона.* Признаками живого зародыша являются: активные движения зародыша, кровеносные сосуды ХАО отчетливо видны. Признаки павшего зародыша: отсутствие активных движений зародыша, тусклые спавшиеся кровеносные сосуды.

Строение куриного эмбриона

Обычно курица откладывает оплодотворенное яйцо, в котором зародыш находится на стадии бластулы или ранней гаструлы. При нагревании яйца до температуры, близкой к температуре тела курицы, происходит дальнейшее развитие зародыша. В ***период с 5-го по 12-й день*** инкубации куриные эмбрионы могут быть использованы для заражения вирусами. В эмбрионе различают следующие **элементы** (рис. 45)**:**

- *скорлупа* – твердая пористая оболочка, снаружи покрывающая яйцо с развивающимся куриным эмбрионом;
- *подскорлупная оболочка* – тонкая пленка, плотно прилегающая к скорлупе;
- *аллантоисная полость* - находится сразу под подскорлупной оболочкой, покрывающая амнион и желточный мешок, в ней собираются продукты обмена;
- *хорион-аллантоисная оболочка (ХАО)* – окаймляет аллантоисную полость, образована в результате срастания полости и хориона, богата кровеносными сосудами, которые снабжают эмбрион кислородом – функция органа дыхания;
- *воздушная камера* – область в тупом конце яйца, заполненная воздухом. Образована она путем разделения подскорлупной оболочки на два листка.
- *тело зародыша (эмбрион)* - лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры;

- *амнион* – полость, в которой погружен эмбрион, заполненная околоплодной жидкостью;
- *желточный мешок* – запас питательных веществ, пуповиной связан с эмбрионом, также располагается эксцентрично и относительно зародыша как бы по другую сторону продольной оси;
- *белок* – расположен в остром конце яйца.

Накопление вирусов происходит во всех структурах эмбриона, имеющих клеточное строение (зародыш, ХАО, желточный мешок). Многие вирусы могут накапливаться в аллантоисной и амниотической жидкостях, образуя практически готовую суспензию вирусов.

Заражение в ту или другую часть эмбриона проводится в период ее максимального развития, когда количество чувствительных клеток будет наибольшим.

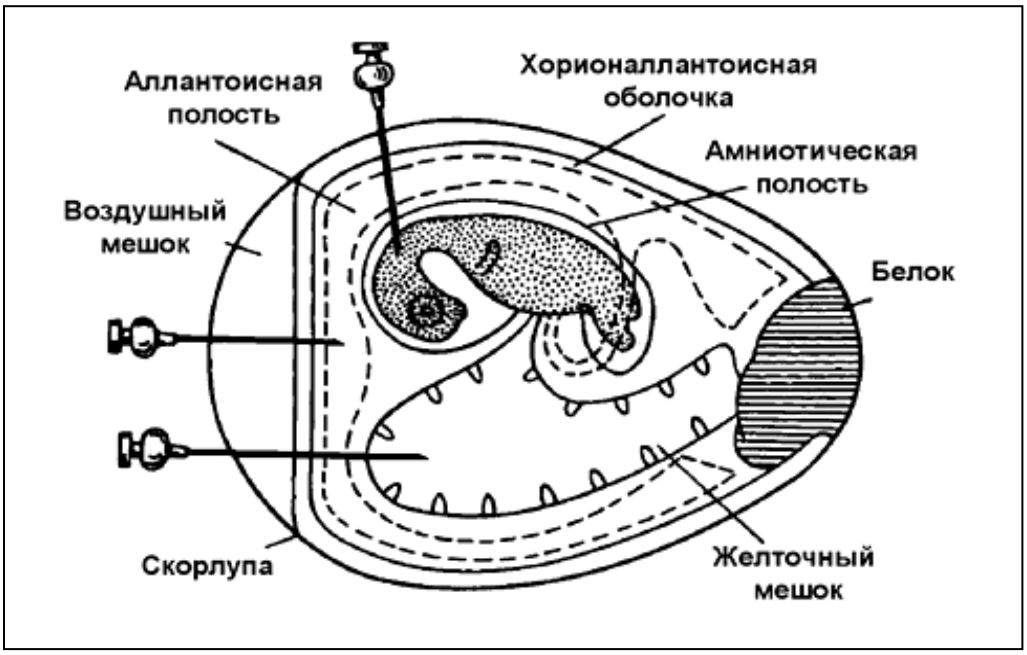


Рисунок 45 – Строение куриного эмбриона

Топография куриного эмбриона (продольный разрез, 12 дней):
1. Скорлупа
2. Подскорлупная оболочка
3. Воздушная камера
4. Аллантоисная полость
5. Желточный мешок
6. Альбуминный мешок / белок
7. ХАО – хорион-аллантоисная оболочка
8. Амниотическая полость
9. Эмбрион
10. Канатик (соединение желточного мешка с пуповиной)

Способы заражения куриного эмбриона

Для заражения выбирают здоровые эмбрионы. Перед заражением куриный эмбрион *овоскопируют* – просматривают с помощью прибора - овоскопа, для определения жизнеспособности и положения зародыша. На скорлупе делают пометки простым карандашом – отмечают границы воздушной камеры и местоположение зародыша. Затем дезинфицируют скорлупу, обрабатывая ее при помощи тампона с йодированным спиртом, фламбируют. После дезинфекции производят заражения куриного эмбриона вируссодержащим материалом.

В практике, часто используют ***заражение*** в аллантоисную полость и на ХАО, реже в желточной мешок и амнион, и еще реже в тело зародыша и кровеносные сосуды. Объем заражающей дозы 0,1 - 0,2 мл.

Метод заражения зависит от тропизма вводимого вируса, и в зависимости от метода выбирают возраст эмбриона:

- для заражения в аллантоисную полость используют ***9-12-дневные*** эмбрионы;
- в амнион – ***6-10-дневные***;
- на ХАО – ***10-12-дневные***;
- в желточный мешок – ***5-7-дневные.***

Инкубируют куриные эмбрионы в инкубаторе или термостате при температуре 37-30^{0}С, при относительной влажности 63-65% и периодической вентиляцией.

Методика проведения заражения куриного эмбриона

Заражение в аллантоисную полость. Эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх и в скорлупе на стороне зародыша, отступая 5-6 мм от края воздушной камеры к её середине, делают отверстие и через него вводят иглу шприца на глубину 10-12 мм и производят инъекцию вируссодержащего материала. Иглу извлекают, отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина.

Заражение на хорион-аллантоисную оболочку (ХАО).

Заражение на ХАО проводят через естественную воздушную камеру. Для этого куриный эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх и остроконечными глазными ножницами в скорлупе, против центра воздушной камеры, вырезают отверстие диаметром 15-20 мм. Пинцетом осторожно снимают подскорлупную оболочку, и на обнажившуюся ХАО наносят вируссодержащий материал. Отверстие закрывают лейкопластырем.

Заражение в желточный мешок. Куриный эмбрион в штативе вертикально тупым концом вверх. В скорлупе, в центре воздушной камеры, делают отверстие диаметром 1-3 мм и вводят иглу шприца под углом 45^0 в направлении противоположном стороне, на которой находится зародыш и, на глубину 40-45 мм и производят инъекцию. Отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина.

Заражение в амнион. Эмбрион укрепляют вертикально тупым концом вверх. В скорлупе над воздушной камерой делают отверстие и вводят тупую длинную иглу в направлении эмбриона. После этого иглу нужно осторожно подвигать. Если эмбрион повторяет движение, значит, игла попала в амнион.

После этого производят инъекцию. Отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина.

После заражения куриного эмбриона на скорлупе простым карандашом делают надпись о том, когда и чем заражен эмбрион.

Зараженные куриные эмбрионы помещают в термостат для дальнейшей инкубации, в процесс которой происходит репродукция внесенных вирусов и их накопление в соответствующих структурах.

Самостоятельная работа. Студенты берут КЭ, овоскопируют его, дезинфицируют и заражают в аллантоисную полость. На скорлупе куриного эмбриона простым карандашом делают надпись, и чем заражен эмбрион, а также пишут свою фамилию и группу. Затем сдают зараженные куриные эмбрионы дежурному, который относит эмбрионы и термостат для дальнейшей инкубации. Использованные инструменты также сдают дежурному.

Контрольные вопросы:

1. Строение куриного эмбриона (КЭ).
2. Использование КЭ в вирусологии.
3. Требования, предъявляете к КЭ.
4. Преимущества КЭ перед лабораторными животными.
5. Методы заражения и отчего это зависит.

2.8 Вскрытие куриного эмбриона, индикация вируса и получение вируссодержащего материала

Цель занятия. Освоить технику вскрытия куриного эмбриона

Задание:

1. Знать патологоанатомические изменения куриного эмбриона.
2. Уметь вскрывать эмбрион и идентифицировать вирус.

Материальное оснащение: штатив для куриных эмбрионов, спиртовка, стерильные глазные ножницы и пинцеты, чашки Петри, пробирки с физиологическим раствором, пустые пробирки, пипетки 5-10 мл, баллончики к пипеткам, овоскоп; дезинфицирующий раствор; питательные среды - МПА, МПБ, среда Китта-Тарроци.

О присутствии и размножении вируса в курином эмбрионе судят по гибели эмбриона и по патологоанатомическим изменениям в зародышевых структурах.

Индикация вируса в курином эмбрионе:

1. *Гибель куриного эмбриона* в характерные для данного вируса сроки. Гибель эмбрионов в первые сутки не специфична. Эмбрионы, погибшие в более поздние сроки, переносятся в холодильник ($+4^0$C). Все эмбрионы извлекают из термостата в момент максимального накопления вируса. Срок для каждого вируса определяется по справочным данным.

2. Вскрытие эмбриона и *анализ патологоанатомических изменений:*
- Отечная ХАО и белые узелки некроза (оспины).
- Мутность или изменение цвета аллантоисной и амниотической жидкостей. Красноватый цвет жидкостей – результат гемолиза.
- Изменения зародыша: карликовость, кровоизлияния, мумификация.
- Органы зародыша – некроз, кровоизлияния.

3. Наличие *гемаглютинации* - при проведении капельной реакции ГА. (аллантоисная жидкость + 5% р-р эритроцитов кур).

Гибель зараженных куриных эмбрионов устанавливают путем ежедневного овоскопирования. После определенного для каждого вируса срока инкубации, зараженные куриные эмбрионы вскрывают с целью анализа патологоанатомических изменений и взятия вируссодержащего материала для дальнейшего исследования. Перед вскрытием куриный эмбрион охлаждают, выдержав их не менее двух часов в холодильнике при температуре $+4^0$С.

В качестве *вируссодержащего материала* в зависимости от тропизма вируса могут быть взяты аллантоисная и амниотическая жидкости, ХАО, желточный мешок, тело зародыша.

Для вскрытия, куриный эмбрион фиксируют воздушной камерой вверх, скорлупу дезинфицируют и ножницами срезают её над воздушной камерой. Пинцетом удаляют под скорлупную оболочку. Затем слегка наклонив эмбрион, пипеткой прокалывают ХАО и отсасывают аллантоисную жидкость (5-6 мл). Жидкость может быть мутной, кровянистой. Наличие гемагглютинирующих вирусов определяют реакцией гемагглютинации (рис. 46).

Взятие амниотической жидкости. После отсасывания аллантоисной жидкости приступают к взятию амниотической жидкости. Для этого захватывают пинцетом эмбрион и пипеткой, проколов амниотическую оболочку, отсасывают жидкость. Количество её 0,5-1,5 мл. Обычно жидкость мутна, иногда имеет голубоватый оттенок.

Взятие желточного мешка. После отсасывания аллантоисной и амниотической жидкости извлекают её содержимое эмбриона в стерильную чашку Петри. Двумя пинцетами берут желточный мешок, осторожно выдавливают его содержимое, а сам мешок помещают в другую чашку Петри, т.к. вирус накапливается в оболочке желточного мешка. Желточный мешок растирают в ступке и готовят суспензию.

Взятие хорионаллантоисной оболочки. ХАО извлекают последней и помещают в чашку Петри со стерильным физиологическим раствором, под которую положен кусок черной бумаги. Оболочку отмывают, расправляют и исследуют макроскопически с целью установления в ней отека, кровоизлияний, наличия оспин и др. поражения. На темном фоне хорошо видны патологоанатомические изменения. Для гистологического исследования готовят поперечные срезы оболочки. Для постановки РИФ (реакции иммунофлюоресценции) отпечатки с неё. Для последующего заражения готовят суспензию ХАО.

Из всего взятого материала делают высев на питательные среды с целью ***исключения бактериальной инфекции*** и готовят препараты-мазки.

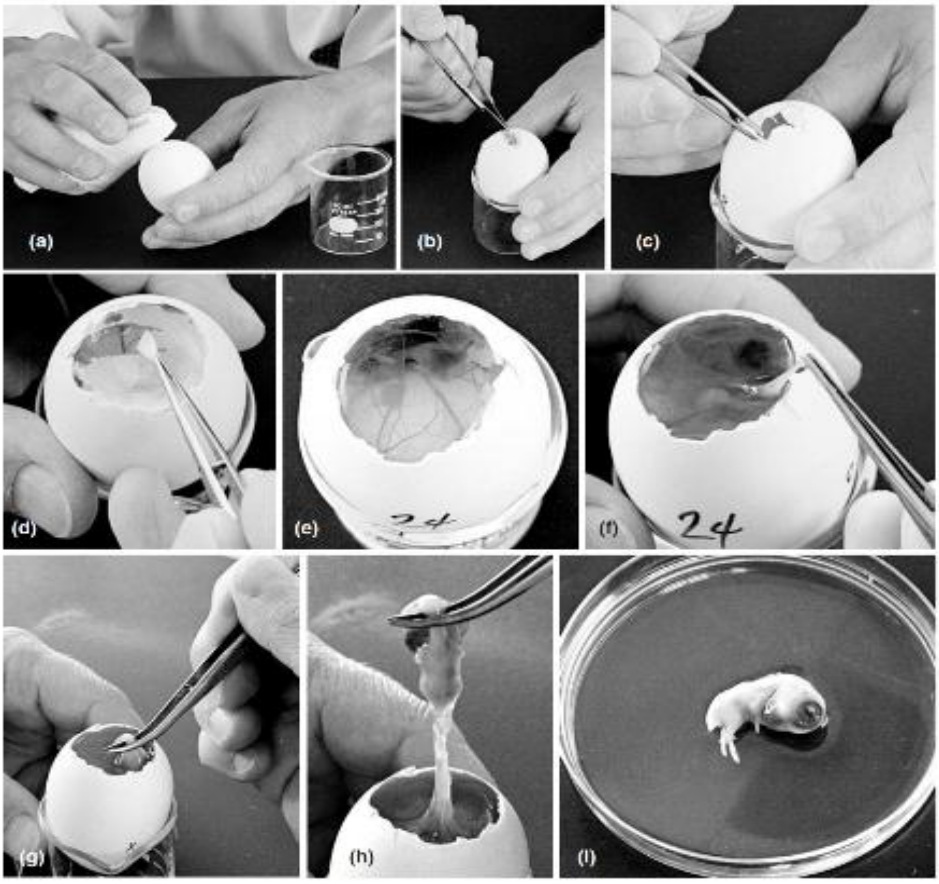


Рисунок 46 – Этапы вскрытия куриного эмбриона

ЗАПОМНИТЬ:

Основные способы заражения: амнион, аллантоисная полость, хорион-аллантоисная оболочка (ХАО) и желточный мешок.

- на хорион-аллантоисную оболочку (ХАО)
- в аллантоисную полость
- в полость желточного мешка
- в полость амниона
- в тело эмбриона

индикация вируса:

- гибель эмбриона
- морфологические изменения эмбриона/оболочек
- РГА с жидкостью из полостей куриного эмбриона

идентификация вируса:

- РН (в т.ч. РТГА)
- РСК

Контрольные вопросы:

1. Значение КЭ в культивировании вирусов.
2. Инкубация КЭ после заражения
3. Специфическая и неспецифическая гибель КЭ.

4. По каким критериям судят о присутствии и размножении вируса в КЭ?
5. Индикация вируса в зародышевых структурах.

2.9 Культуры клеток и их использование в вирусологии

Цель занятия. Ознакомить с общими сведениями о культурах клеток, применяемых в вирусологических исследованиях.

Задание:

1. Знать основные типы культур клеток.
2. Усвоить методы индикации вируса в культуре клеток.

***Материальное оснащение*:** питательные среды - №199, Игла; сыворотки крови, гидролизат лактоальбумина, солевые растворы: Хенкса, Эрла, Тироде, растворы трипсина, версена, пробирки, флаконы, матрасы, панели, бутыли. Магнитная мешалка, центрифуга, колба с магнитом, градуированные пипетки на 1,2,5,10 мл; пробирки, центрифужные пробирки, воронки с двухслойной марлей, шланг резиновый с грушей, резиновые пробирки, ножницы, пинцет, спиртовка, чашки Петри, микроскопы, камера Горяева, индикаторная бумага, 7,5%-ный раствор NaHCO 5%-ный раствор HCI, пенициллин, стрептомицин, физиологический раствор, 0,2%-ный раствор трипановой сини.

Современное развитие вирусологии обусловлено в значительной степени внедрением в практику клеточных культур.

Культурами клеток *(cell culture)* называются клетки многоклеточного организма, растущие и размножающие вне организма (*«в пробирке» - in vitro)*.

Метод культивирования вирусов на клеточных культурах, разработали и внедрили в практику американские вирусологи Джон Эндерс (J.Enders), Фредерик Роббинс (F.Robbins) и Томас Уэллер (T.Weller), в 1948-1955 гг.

В настоящее время, культура клеток широко применяется в вирусологии:

1. Для изучения биологии вируса (механизм репродукции, взаимоотношения между вирусом и клеткой).
2. Для количественного изучения вирусов и вируснейтрализующих антител.
3. Для диагностических целей - выделения вируса из первичного материала.
4. Для производства лечебно-профилактических и диагностических препаратов (вакцин, диагностикумов, интерферона).

Достоинства: метод культур клеток выполним, экономичен.

Недостатки в применении культуры клеток, особенно в производстве вакцин: это частое загрязнение (контаминация) исходного тканевого материала латентными вирусами, микоплазмами и другими микроорганизмами.

Массовое применение культур тканей и клеток в лабораториях мира и использование этой методики для различных целей привела к терминологической путанице. 3 июня 1966г. в Сан-Франциско на ежегодном совещании Ассоциации тканевых культур была предложена унифицированная терминология для тканевых культур животных.

Ниже приведены **основные термины** в сокращенном варианте:

Тканевая культура - это сборное понятие, обозначающее систему, в которой клетки, ткани или органы, изъятые из организма животного, сохраняют жизнеспособность или способность размножаться *in vitro* более чем 24 часа.

В зависимости от вида биологического объекта, от того, что должно поддерживаться выращиватся - клетки, ткани или органы различают:

а) **культуру клеток** - клетки, растущие in vitro без образования ткани;

б) **культуру тканей или органов** - поддержание или рост тканей и целого органа (или его кусочек) in vitro, при сохранении их дифференциации, структуры и функции.

Эксплантат – изолированный кусочек ткани или органа, используемый для культивирования.

Монослой – клетки, растущие в один слой на определенной поверхности.

Суспензионная культура – тип культуры клеток, при которой клетки размножаются во взвешенном состоянии в питательной среде.

Первичная культура - культура, полученная из клеток, тканей или органов, взятых непосредственно из организма. Культура считается первичной до тех пор, пока она не субкультивируется.

Первичные культуры получают непосредственно из нормальных или опухолевых тканей человека или животных методом эксплантации или трипсинизации тканей, обладающих ростовыми потенциями (*эмбриональные:* костно-мышечная ткань, амнион, легкое и т.д.; *взрослые:* кожа, почечная паренхима и т. д.). При этом чаще всего получают культуры эпителиальных клеток или фибробластов.

Клеточная линия получается из первичной культуры после первого пассажа, состоит из разнотипных клеток, представленных в первичной культуре.

Стабильная (перевиваемая) клеточная линия – линия клеток, способная субкультивироваться in vitro до бесконечности. Стабильной она считается тогда, когда прошла не менее 70 пассажей с трехдневными интервалами.

Клеточный штамм – это популяция однородных клеток (по одному или нескольким признакам – *маркерам*). Получают ее из первичной культуры или из клеточной линии, при этом маркеры должны сохраняться в процессе последующего культивирования.

Клон – популяция клеток, происходящая от одной клетки путем митоза. Клон не всегда однороден.

Культуры клеток, применяемые в вирусологической практике, можно разделить на однослойные и суспензионные.

1. Однослойные культуры клеток, в которых клетки растут и размножаются, плотно прикрепившись к поверхности стекла (пробирок, матрасов) и располагаясь слоем толщиной в одну клетку.

Однослойные культуры клеток **делятся 3 вида**:

а) Первичные культуры клеток – получают непосредственно из тканей животных. Они обладают диплоидным набором хромосом и не способны к длительным перевивкам (пассажа).

б) Диплоидные культуры клеток – получают из первичных, они обладают

диплоидным набором хромосом, и способны к большому (50-70 пассажей), но ограниченному количеству перевивок.

в) Перевиваемые культуры клеток – получают из первичных, это потерявшие диплоидный набор хромосом (он стал гетероплоидным), и способны к неограниченному числу перевивок клетки.

2. Суспензионные культуры клеток - клетки живут и размножаются, будучи взвешенными, в жидкой питательной среде.

Суспензионному культивированию поддаются только некоторые из перевиваемых и диплоидных культур клеток.

Рисунок 47 - Планшеты (матрасы) для культивирования культур клеток

Подготовка посуды для культуры клеток

Посуда (пробирки, колбы, флаконы, матрасы, бутыли, пипетки, резиновые трубки, пробки) для культуры клеток должна быть абсолютно чистой и стерильной из нейтрального стекла. Неправильная мойка может послужить причиной отслоения клеток от стекла или быстрой дегенерации клеточного монослоя.

Посуда замачивается в теплом растворе порошка на сутки, моют ершами, 6-8 раз ополаскивают водопроводной водой, встряхивают, промывают дистиллированной водой, сушат и стерилизуют в автоклаве. Новую посуду дополнительно обрабатывают растворами двухромовокислого калия в серной кислоте (хромпик) или соляной и серной кислотой.

Резиновые изделия также выдерживают в растворе моющих средств, моют в них, промывают теплой водопроводной водой, кипятят в эмалированных баках 1 час в растворе 0,3% двууглекислой соли, снова промывают, кипятят в 2%-ном растворе соляной кислоты 30 минут, многократно промывают водопроводной, дистиллированной водой, сушат, монтируют и стерилизуют.

Питательные среды, применяемые для культур клеток

Для выращивания клеток *in vitro* необходимы питательные среды, которые содержат все необходимое для жизни клеток.

Питательные среды ***различают естественные и синтетические.***

К естественным питательным средам относят:

1. Сыворотка крови крупного рогатого скота, которую получают из крови клинически здоровых животных.

2. Ферментативные гидролизаты различных белковых продуктов. К ним относятся гидролизаты лактоальбумина, казеина, гемогидролизата и другие.

Синтетические питательные среды - получают добавлением к солевым растворам всех известных аминокислот, витаминов, предшественников нуклеиновых кислот, факторов роста, источников липидов. Наиболее широко в вирусологии используются *среда 199, среда Игла*.

Питательные среды для культур клеток также делят на:

- ***поддерживающие*** (не содержат сыворотку крови) — для поддерживания жизнеспособности клеток, при этом клетки не размножаются;
- ***ростовые*** (содержат до 5-10% сыворотки крови) – обеспечивают жизнеспособность и размножение клеток.

Питательные синтетические среды готовятся на солевых изотонических растворах. Солевые растворы сбалансированы по ионам, осмотическому давлению и др. показателями. Используют следующие солевые растворы: Тироде, Эрла, Хенкса, которые состоят из солей Ca, Na, K, Mg.

Кроме того, для дезагрегации тканей используют ***диспергирующие растворы*** трипсина, панкреатина, гиалуронидаза, коллагеназа.

Получение первичных трипсинизированных культур клеток

В стерильных условиях ткань измельчают, промывают и помещают в растворе фермента на магнитную мешалку. Полученную суспензию клеток центрифугируют, осадок клеток разводят ростовой средой до оптимальной концентрации. После посева в *культуральные флаконы* (рис. 48), клетки прикрепляются к стеклу и адаптируются к условиям in vitro (фаза стабилизации, lag-фаза), затем они начинают активно размножаться/пролифилировать (фаза логарифмического роста, log-фаза), затем вступая в стационарную фазу, образуя монослой.

Рисунок 48 – Культуральные флаконы

Контрольные вопросы:
1. Значение клеточных культур в вирусологических исследованиях.
2. Виды культур клеток.
3. В чем преимущества культур клеток над другими лабораторными системами?
4. Терминология, применяемая в культуре клеток и тканей.
5. Виды питательных сред и солевые растворы.

2.10 Индикация вирусов в культуре клеток по цитопатогенному действию

Цель занятия. Изучить цитопатогенное действие (ЦПД) вируса на культуру клеток.

Задание:

1. Методы индикации вируса в культуре клеток.
2. Изучить цитопатогенный эффект вируса.

Материальное оснащение: микроскопы, осветители, культуры клеток, препараты из фиксированных окрашенных культур клеток, таблицы по теме.

Индикацию вируса в культуре клеток проводят следующими **методами:**
1. Выявление цитопатогенного действия (ЦПД);
2. По положительной гемадсорбции;
3. По феномену образования бляшек;
4. По наличию специфических телец-включений;
5. По подавлению метаболизма клеток (цветная проба);
6. По обнаружению специфического антигена методом флуоресцирующих антител.

1. Многие вирусы при размножении в клетках оказывают **цитопатогенное действие (ЦПД)**, которое проявляется морфологическими изменениями в клетках.

Характер ЦПД, время его развития зависит от вида и дозы инокулируемого вируса. Однако *необходимо отличать* ЦПД вирусов от «возрастного» дегенеративного изменения в старых культурах и от дегенерации клеток, вызванной контаминнрующими вирусами.

Оценку интенсивности ЦПД проводят по крестовой системе:
++++ - это деструкция всех клеток в монослое;
+++ - деструкция 3/4 клеток;
++ - деструкция 1/2 клеток;
+ - деструкция 1/4 клеток.

ЦПД клеток проявляется в форме:

1) округления клеток – когда клетки теряют способность прикрепляться к стеклу (обычно должны быть распластанными) и становятся шаровидными, переходят в культурную жидкость и погибают;
2) фрагментация клеток – это разрушение клеток на фрагменты;
3) симпластообразования – вследствие лизиса клеточных оболочек, цитоплазмы

соседних клеток сливаются в одно целое и образуют *симпласты со многими ядрами.*

На основании этих деструктивных изменений можно ориентировочно судить, к какой группе данный вирус относится, окончательный диагноз подтверждают при типировании специфической сывороткой в реакциях.

2. Реакция гемадсорбции (РГАд) - метод обнаружения вируса.

Суть ее заключается в том, что в культуру клеток, зараженных вирусом, добавляют 0,5%-ную суспензию отмытых эритроцитов. Эритроциты после контакта с вирусом адсорбируются на поверхности клеток. Гемадсорбцию вызывают только те вирусы, которые вызывают гемагглютинацию этих эритроцитов.

3. Образование бляшек – по этому методу также можно судить о размножении вирусов. В вирусологической практике этот метод применяется при титрировании вирусов и антител.

Метод бляшек состоит в том, что в матрасах с монослоем клеток удаляют ростовую среду, добавляют суспензию вируса, оставляют на 1-2 часа в термостате для адсорбции/прикреплении вируса. Затем слой клеток покрывают расправленным агаром с питательной средой. Матрасы помещают в термостат клетками вверх. Вирус в результате репродукции вызывает гибель клеток, проникает в соседние клетки, которые также погибают. Таким образом, в монослое животных клеток появляются *островки мертвых клеток, над которыми цвет агара не меняется*, остаются светло-желтыми, тогда как *над живыми клетками цвет агара меняется* в результате подкисления продуктами метаболизма клеток.

Эти светлые пятна на розово-красном фоне **называются бляшками**. Титр вируса определяют по формуле 1:

$$A = \frac{a \times в}{V} \quad (1),$$ где

A – число БОЕ (бляшкообразующая единица;
a – среднее число бляшек в 1 флаконе;
в – разведение вируса;
V – объем введенного вируса в матрас.

4. Обнаружение специфических телец-включений в препаратах из зараженных культур клеток также является методом идентификации некоторых вирусов.

Для этого, культуры клеток выращивают на стеклах, заражают вирусом, затем препарат фиксируют, окрашивают и под световым или электронным микроскопом обнаруживают специфичные для определенного вируса тельца-включения

Например, тельца-включения образуют аденовирусы крупного рогатого скота в ядре клеток; вирусы оспы и контагиозной эктимы в цитоплазме клеток.

5. Цветная проба - основана на изменении цвета питательной среды, которая содержит pH-индикатор – феноловый красный.

При заражении клеточных культур цитопатогенным вирусом подавляется их метаболизм, и клетки постепенно гибнут. В результате, в культуральной жидкости происходит задержка подкисления и цвет среды не меняется (не желтеет) остается красным или желтеет медленно. Таким образом, цитопатогенный вирус можно выявить методом цветной пробы.

6. Метод флуоресцирующих антител (МФА) – с помощью него можно обнаружить вирусные *антигены*, локализованные на поверхности культуры клеток. Для этого используются суспензионные клетки, которые после соответствующей обработки соединяют с ФИТЦН-антителами (антитела, окрашенные флуоресцирующими красками).

Препараты, приготовленные из этих клеток, исследуют под *люминесцентным микроскопом* и наблюдают ***специфическую флуоресценцию***.

Контрольные вопросы.

1. В чем проявляется ЦПД вируса?
2. Отличие ЦПД от неспецифической «возрастной» дегенерации клеток.
3. Формы проявления ЦПД.
4. Оценка ЦПД вируса.
5. Что такое БОЕ?
6. Методы индикации вируса в культуре клеток.

2.11 Бактериофаги. Идентификация фага в культуре бактерий

Цель занятия. Ознакомить обучающихся с бактериофагами и применением их в вирусологической практике.

Задание:

1. Дать определение бактериофагам
2. Определить активность фага в бактериальной культуре

Материальное оснащение: стерильные чашки Петри, стерильные пастеровские или градуированные пипетки, бактериологические петли, 1,5% МПА, культура бактерий, гомологичный и гетерологичный фаги, карандаши по стеклу, таблицы.

Бактериофаги – это вирусы бактерий. Они способны инфицировать/ заражать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать лизис клеток, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

Фаги широко встречаются в почве, воде, в кишечнике человека, животных, птиц, в их экскрементах, в молоке, у всех патогенных и многих непатогенных микробов.

Впервые выделили фаги в 1917 году, французский ученый Д'Эрель из фекалий больных дизентерией людей.

Классификация фагов:

1. По типу нуклеиновой кислоты фаги делятся: ДНК и РНК-содержащие.
2. По взаимодействию с бактериальной клеткой: умеренные и вирулентные.

Вирулентные фаги вызывают лизис бактериальной клетки.

Умеренные фаги устанавливают симбиотическое взаимоотношение с клеткой. Бактерии несущие умеренный фаг называются *лизогенными*, а форма бактериофага в лизогенной бактерии - **профаг.**

3. По отношению фагов к половой дифференциации бактерий:
   а) f-1, f-2, QB, MS-2 - атакующие только мужские бактерии.
   б) Т-3, Т-7, Ф-1 1 - взаимодействуют с женскими клетками.
   в) Индиферентные к половой дифференциации клеток.
4. По морфологии:

1) Крупные - вирулентные коли-фаги (гр. Т)

Группа Т в свою очередь делится:

а) четные и нечетные: Т-1, Т-2, Т-3, Т-4, Т-5, Т-6, Т-7.
б) умеренные кишечные фаги: *Х*, Р-1, Р-2, Р-22.

2) Мелкие - РНК-содержащие фаги: f-2, MS-2, М-12.
ДНК-содержащие фаги: ФХ-174.

Более сложно устроены Т- четные фаги *E.coli* Т-2, Т-4, Т-б; некоторые из фагов *Bac.subtilis* - SPO-1, SP-8, SP-82 и др. Эти фаги имеют вытянутую гексагональную головку и ригидный хвостовой отросток и прикрепленный сократительный чехол.

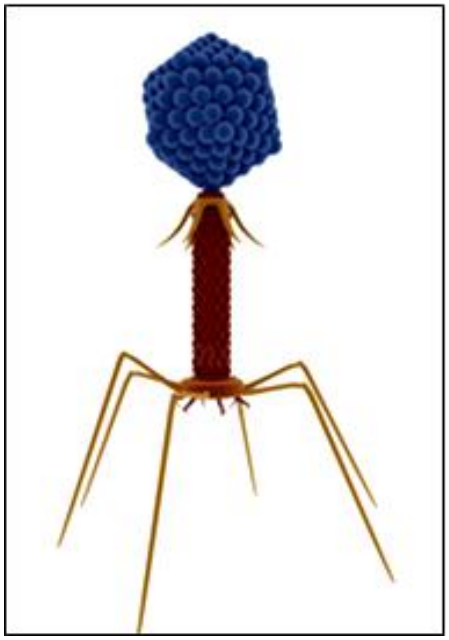


Рисунок 48 - Бактериофаг

а) Хвост - 100 нм диаметр 2,5 нм.

б) кишечные фаги Т-1, Т-5, умеренный фаг *Х* имеют гексагональную головку и хвостик.

в) фаги имеют крупную гексагональную головку и короткий хвостовой придаток-Д11ЬС - содержащие фаги Т-3, Т-7.

г) бес хвостовые ДНК — содержащие мелкие фаги- ФХ-174 полигональная структура капсида.

д) РНК- содержащие фаги, характеризующиеся малыми размерами. Это кишечные фаги-f-2, f-7, М-2, R-17.

е) нитеобразные кишечные фаги, содержащие однонитчатую ДНК, длина до 800 им, диаметр бнм. Большинство этих фагов взаимодействуют с мужскими штаммами/

Бактериофагия - взаимодействие фага и бактериальной клетки.

Процесс взаимодействия бактериофага и бактерии состоит из **7 этапов:**

1. Адсорбция путем взаимодействия рецепторов фага, находящихся в хвосте фага, И поверхности микробной клетки.
2. Растворение оболочки микробной клетки с помощью фермента лизоцима.

3. Впрыскивание НК фага через канал хвостового отростка и образовавшееся в оболочке клетки отверстие в цитоплазму.
4. Блокирование НК и ингибиторами (ранние белки) фага деятельности ядра клетки.
5. Репродукция молекул фаговой нуклеиновой кислоты.
6. Синтез фагового белка (поздний белок).
7. Сборка фаговых частиц и выход их из клетки, что сопровождается ***лизисом*** (вирулентные фаги) или ***лизогенией*** (умеренные фаги) бактериальной клетки.

Бактериофаги используются:

- для идентификации бактерий (фаготипирование);
- диагностики (фагодиагностика, реакция нарастания титра фага - РНТФ),
-профилактики и лечения инфекционных болезней.

Выявление фагов:

1. Путем электронной микроскопии.
2. Обнаружения действия фагов на популяцию чувствительных бактерий:

а) добавлением вирулентного фага к взвеси бактерий и с последующей инкубацией при t=37-38°С – это ведет к лизису бактерий, что сопровождается просветлением культуральной среды, содержащей бактерии.

Скорость просветления среды зависит от количества содержащихся в ней бактериофагов.

Если фаголизирующую культуру инкубировать большее время, то может появиться вторичный рост за счет размножения селекционированных в бактериальной популяции - резистентных мутантов.

Если инфицировать бактерии умеренным фагом, то образуется умеренное помутнение культуры, а затем нарастает помутнение за счет роста и размножения лизогенезированных бактерий.

б) Количество жизнеспособных фагов определяют на твердой питательной среде (по Грациа методу). На засеянных газоном чувствительных бактерий определяют участки лизиса культуры, которые называются бляшками фага или негативные колонии, или стерильные пятна.

Вирулентные фаги образуют прозрачные негативные колонии.

Умеренные фаги образуют мутные колонии.

Число колоний или бляшкообразующих единиц (БОЕ) умножают на разведения исходной взвеси фагов, что дает величину **титра фага,** то есть количество БОЕ в 1 мл исходного препарата.

Самостоятельная работа студентов

В чашку Петри разлить 1,5% расплавленный мясопептонный агар. После застывания агара карандашом по стеклу дно чашки Петри делят на два сектора. На агар в чашки Петри густым газоном засевают 16-18 часовую культуру. Спустя 5-10 минут после посева, на подсушенную поверхность питательной среды каплями наносят гомологичный и гетерологичный фаги (в разные сектора). Затем чашки подсушивают, переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре 37 С на 18-24 часа.

Учет опыта проводят:

1) по полному отсутствию роста культуры в месте нанесения капли фага (активный бактериофаг).

2) по наличию мелких стерильных пятен - колоний бактериофага (бактериофаг слабой активности).

Контрольные вопросы:

1. Морфология бактериофага. Виды бактериофагов.
2. Химический состав бактериофага.
3. Особенности взаимодействия фага с клеткой.
4. БОЕ (бляшкообразующая единица) фага.
5. Методы выявления фага.
6. Практическое применение фага.

Список используемой литературы

1. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч.1 – М.:КолосС, 2007 г. - 184с.
2. Госманов Р.Г., Колычев Н.М. Ветеринарная вирусология. - М.: Колос, 2006 г. - 304 с.
3. Никитина Е. В., Киямова С. Н. Микробиология – СПб.: «ГиоРд», 2008 г. – 361с.
4. Сидоренко О.Д. Микробиология. - М.: ИНФА-М, 2009г. - 287с.
5. Зыкин Л.Ф. Клиническая микробиология для ветеринарных врачей. - М.: Колос, 2006г. - 96с.
6. Нетрусов А.И. Микробиология .- М.: «Академия», 2006г. – 351с.
7. Тулемисова Ж.К. Практикум по микробиологии и вирусологии. – Алматы, 2008. – 166 с.
8. Матюхина З.П. Основы физиологии, микробиологии, гигиены и санитарии. – М.:Академия, 2008. – 207с.
9. Сюрин В. Н. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: Колос, 1991 г.- 435с.
10. Белоусова Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии. М.: Колос, 2006г. -248с.