МАЙКОПСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии

(Общая часть)

Майкоп
2009

МАЙКОПСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. (Общая часть)

УДК [578 + 579] (075. 8)
ББК 52. 6 я 73
Х 54

р е ц е н з е н т ы : **Агиров А.Х.,** д.м.н., профессор, руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Адыгея.
Бабичев С.А., д.м.н., доцент кафедры микробиологии Краснодарской государственной медицинской академии

Хиштова Н.С.
Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии (общая часть) / Н.С. Хиштова.- Майкоп: ОАО «Полиграфиздат» «Адыгея», 2008.- 108 с.

Пособие рекомендуется для самостоятельной подготовки к практическим занятиям. Изложены общие сведения о методах изучения и идентификации микробов. Рассказано о методах стерилизации и определении чувствительности к антибиотикам. Описаны основы прикладной иммунологии. Приведены современные методы диагностики многих инфекций.
Пособие предназначено для студентов медицинских вузов

Хиштова Н. С., оформление, 2008

Предисловие

«Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии» дополняет учебник по этой специальности и позволяет овладеть современными микробиологическими, вирусологическими и иммунологическими методами, используемыми при диагностике инфекционных заболеваний человека.

Пособие состоит из трех частей. Первая часть «Морфология микроорганизмов» знакомит с основными лабораторными методами изучения морфологии микроорганизмов, с существующими методами окраски для изучения морфологии и структур микробной клетки.

Во второй части «Физиология микроорганизмов» описаны приемы бактериологической техники, постановки накопительных культур для выделения физиологических групп микроорганизмов и получение чистых культур. Изложены приемы и способы изучения физиолого - биохимических свойств чистых культур микроорганизмов и их идентификации. Приведены способы культивирования анаэробных и аэробных микроорганизмов, методы определения антимикробного действия антибиотиков.

Третья часть «Инфекция и иммунитет» посвящена изучению инфекционного процесса и прикладной иммунологии. Авторами учтены последние достижения науки, при составлении пособия использованы современные инструктивно – методические материалы. В четвертой части «Вирусология» представлены основные методы лабораторной диагностики вирусных инфекций.

Учебный материал излагается по отдельным главам и темам. Каждая тема рассчитана на одно или несколько занятий в зависимости от их продолжительности. Идентификация возбудителя сопровождается схемами, таблицами и рисунками.

Учебное пособие предназначено для самостоятельной подготовки студентов к лабораторным занятиям.

Содержание:

I. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 7
1. Морфология микроорганизмов 7
2. Микроскопы. Микроскопические методы исследования 9
Простые методы окраски. Негативные методы окраски
2.1. Микроскоп 9
2.2. Негативные способы окраски препаратов 12
2.3. Структуры бактериальной клетки. Методы их окраски и выявления. Сложные методы окраски. 13
Исследование микробов в окрашенном состоянии
2.4. Сложные способы окраски бактерий 17

3. Изучение структуры бактериальной клетки 20
3.1. Ядерная субстанция бактерий 20
3.2. Протоплазма бактерий. Включения 21
3.2. Оболочка бактерий 22
3.3. Способы выявления капсулы 23
3.4. Споры 23
3.5. Жгутики 24
3.6. Исследование микробов в живом состоянии 25

4. Морфология грибков 27
4.1. Морфология грибков 27
4.2. Дрожжи 29

5. Морфология спирохет 29

6. Морфология риккетсий 31

II. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 32
1. Основные приемы бактериологической техники и аппаратура 32
1.1. Обращение с бактериальными культурами 32
1.2. Пересев чистой культуры на плотные питательные среды 33

2. Питание микроорганизмов 34
2.1. Основные питательные среды 35
2.2. Другие питательные среды 38
2.3. Дифференциально - диагностические среды для бактерий кишечно-тифозной группы 39
2.4.Среды с углеводами для “пестрого ряда” 40

3. Культивирование микроорганизмов 42
3.1.Термостат 42

4. Бактериологический метод диагностики. Выделение чистой культуры и её идентификация 43
4.1. Этапы выделения чистой культуры и ее идентификация 43
4.2. Идентификация возбудителя по дням исследования 44
4.3. Бактериологический метод диагностики 44
4.4. Пигменты микробов 49
3.5. Токсины микробов 49
3.6. Определение ферментов (факторов) патогенности 51

4. Дыхание микроорганизмов 51
4.1. Методы культивирования анаэробов 51
4.2. Выделение чистых культур анаэробов 53
4.3. Среды для культивирования анаэробов 53

5. Асептика, антисептика, дезинфекция 54
5.1. Методы стерилизации 54
5.2. Автоклав 55
5.3. Контроль стерилизующей аппаратуры 58
5.4. Опыт дезинфекции 58

6. Антибиотики 59
6.1. Определение чувствительности микробов к антибиотикам 59

7. Микрофлора человеческого тела 60

8. Распространение микроорганизмов в природе 60
8.1. Микроорганизмы и внешняя среда 60
8.2. Микробы в окружающей среде 61
8.3. Антагонизм микробов 62

III. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ 63

1. Инфекция 63
1.1. Экспериментальное заражение животных 63
1.2. Определение вирулентности микробов 66
1.3. Экзотоксины и эндотоксины 67
1.4. Бактериологическое исследование трупа 67

2. Физиологические механизмы естественного иммунитета 69
2.1.Влияние внешней среды на видовой иммунитет 69
2.2. Фагоцитоз 69
2.3. Лизоцим 71

3. Приобретенный иммунитет. Методы иммунизации. Изучение реакций иммунитета 72
3.1. Получение иммунных сывороток 72
3.2. Методы определения токсинов 73
3.3. Реакция преципитации 74
3.4. Реакция агглютинации 76
3.5 Реакция непрямой (пассивной) гемаглютинации 81
3.7. Реакция латекс – агглютинации 82
3.8. Реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА) 82
3.9. Иммуноферментный анализ (ИФА) 82
3.10. Иммунофлуоресцентный анализ 83
(метод флуоресцирующих антител (МФА), люминесцентно- серологический метод (ЛСМ))
3.11. Реакция Кумбса для выявления неполных антител 84
3.12. Реакции лизиса 84
3.13. Реакции иммунитета in vivo (кожные пробы) 88

IV. ВИРУСОЛОГИЯ 89

1.1. Вирусы 89
1.2. Бактериофагия 90
1.3. Методы заражения животных 92
1.4. Заражение культур тканей 92
1.5. Методы заражения куриных эмбрионов 96

I. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В разделе “Морфология и физиология микроорганизмов” изучается форма, строение микробной клетки, физиология и биохимия микроорганизмов.
Все микроорганизмы подразделяются на следующие группы:
1) бактерии;
2) грибки;
3) спирохеты;
4) простейшие;
5) риккетсии;
6) фильтрующиеся вирусы.

Все они, за исключением некоторых грибков, представляют собой одноклеточные организмы. Грибки относятся к растениям; простейшие являются животными организмами; место, занимаемое в системе организмов бактериями, спирохетами, риккетсиями и ультравирусами, до настоящего времени представляется спорным. Ряд исследователей предлагает не причислять бактерий к растениям или животным, а считать их примитивной, но самостоятельной формой жизни. Спирохеты занимают по своим признакам промежуточное положение между бактериями и простейшими.

Морфологические свойства риккетсии дают основание считать их микробами, ближе всего стоящими к бактериям, от которых, однако, риккетсии значительно отличаются другими своими свойствами

Главным объектом рассмотрения в разделах “Морфология микроорганизмов” и “Физиология микроорганизмов” являются бактерии — наиболее распространенные из всех микробов в окружающей среде и являющиеся возбудителями многочисленных инфекционных заболеваний.

1. Морфология микроорганизмов

Изучение морфологии микробов ввиду их малой величины возможно только с помощью усовершенствованного оптического прибора — микроскопа. Величина микробов настолько незначительна, что измеряется тысячными долями миллиметра — микронами, вследствие чего они становятся видимыми только при увеличении их в 500—1 000 раз, что и достигается при помощи исследования под микроскопом. Таким образом, микроскоп является важнейшим прибором, без которого невозможно практическое изучение микроорганизмов.

Первым условием, обеспечивающим успех изучения микроорганизмов, является овладение в совершенстве **бактериоскопическим** методом исследования, который состоит в изучении микробов под микроскопом. Исследованию могут подвергаться как микроорганизмы в живом состоянии, так и убитые окрашенные микробные клетки. Последний способ исследования является наиболее удобным для работы, наиболее простым и поэтому наиболее распространенным.

Известны **три основные формы бактерий**: шарообразная, палочковидная (цилиндрическая) и извитая. В соответствии с этим все бактерии по форме подразделяются на следующие группы:
1) кокки (шарообразные),
2) бациллы (палочковидные),
3) спириллы (извитые в виде спирали).

Кокки — бактерии круглой формы, имеющие в диаметре 1—2 мкм. Они различаются между собой по взаимному расположению отдельных клеток, которое зависит от способа их деления.

- если по окончании деления кокки разъединяются на отдельные шарики, получается форма обыкновенного кокка - *микрококки*.

- группа из двух кокков носит название *диплококка*, клетки делятся в одной плоскости и располагаются попарно (Diplococcus, от греческого слова diplos—двойной, рис. I, *2—3).*

Кроме правильной круглой формы, кокки могут иметь форму овальную или ланцетовидную (например, пневмококки, рис. 1, 3); некоторые кокки имеют сходство с бобом или кофейным зерном, вогнутой стороной обращенных к друг другу (например, гонококки, менингококки, рис. 1, 2).

- если деление кокков происходит лишь в одном направлении и образующиеся кокки не разъединяются, то получается нить из шариков в виде цепи, более или менее длинной в зависимости от числа кокков. Эта форма носит название *стрептококка* (Streptococcus, от streptos—плетеный, рис. 1, *4).*

- при делении в двух взаимно перпендикулярных направлениях возникают сочетания по четыре кокка — *тетракокка* (Tetracoccus, рис. 1, 5).

- если деление происходит в трех взаимно перпендикулярных направлениях, кокки соединяются в виде пакетов или тюков по 8 или 16 клеток в каждом и получают название *с а р ц и н* (Sarcina, от sarcio — соединяю,. рис. 1, *6).*

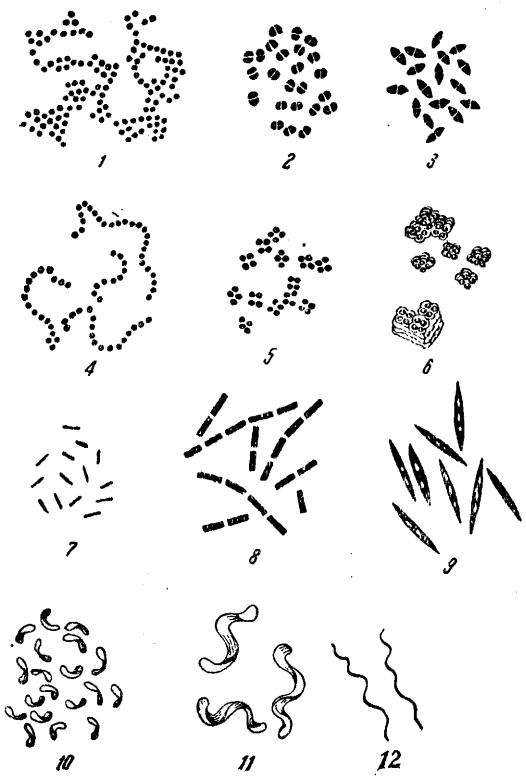


Рис. 1. Основные формы бактерий.
1 — стафилококки; *2—3* — диплококки; *4* — стрептококки; *5* — тетракокки; *6* — сарцины; *7—9* — различные виды палочек; *10* — вибрионы; *11—12* — спириллы.

- делясь в разных направлениях без особой правильности кокки образуют беспорядочные скопления клеток, напоминающие виноградные грозди, почему они и получили название *стафилококков* (Staphylococcus, от staphylos— виноградная гроздь, рис. 1, *1).*

Палочковидная форма представлена самой многочисленной и самой разнообразной группой бактерий (рис. 1, 7, *8,9).*

В классификации палочковидных форм принято именовать **бациллами** те палочки, которые способны образовывать споры; палочки, не способные к спорообразованию, называются **бактериями** (в узком смысле этого слова). Бактерии, спора которых превышает диаметр клетки и деформирует её, называют **клостридиями**. По типу дыхания – это анаэробы. Бактерии, спора которых не превышает диаметр клетки и не деформирует её, называют **бациллами.** По типу дыхания – это строгие аэробы или факультативные анаэробы.

Расположение спор:

- центральное – клостридии газовой гангрены, бациллы сибирской язвы;
- терминальное – спора на конце клетки – клостридии столбняка (барабанная палочка);
- субтерминальное – спора располагается ближе к концу клетки – клостридии ботулизма (теннисная ракетка).

У палочковидных форм в противоположность коккам наблюдаются большие колебания в величине — от нескольких долей микрона до 1—5 мкм и более. В связи с этим различают короткие, длинные, тонкие и толстые палочки.

Для распознавания их важно обращать внимание на концы палочек. Бывают палочки с закругленными концами (палочка брюшного тифа, кишечная палочка- Escherichia coli), с обрезанными краями (палочка сибирской язвы- Bacilllus anthracis); у некоторых палочек

края заострены, вытянуты - веретенообразная палочка, у других, наоборот, утолщены (Corynebacterium diphtheria).

Расположение палочек:

- некоторые палочки располагаются поодиночке – *монобактерии* - кишечная, дизентерийная палочки, гемофильная палочка;
- другие группируются по две бактерии - *диплобактерии* – палочка клебсиеллы пневмонии,
- третьи — цепочками - *стрептобактерии* – палочка сибирской язвы;
- некоторые палочки располагаются *под углом* (палочки дифтерии), образуя фигуры наподобие буквы X или V.

Наконец, к третьей группе бактерий относятся **извитые формы** — спириллы, имеющие вид спирали.

- если у бактерии только один завиток спирали, то она имеет вид изогнутой палочки или запятой и носит название *вибриона* (Vibrio), например, холерный вибрион.
- если несколько крупных завитков, то бактерия называется *спириллой* (рис. 1, 11—12). Не вызывают заболеваний у человека.
- *спирохеты*: боррелии возвратного тифа – имеют 3-4 крупных неравномерных завитка, трепонема паллидум (возбудитель сифилиса)-10- 12 равномерных завитков, лептоспиры – множество мелких равномерных завитков. Концы лептоспир С - образно изогнуты (возбудитель лептоспироза)

Длина вибрионов 1—3 мкм; длина спирилл варьирует от 5 до 30 мкм при толщине от 0,25 до 1 мкм.

2. Микроскопы. Микроскопические методы исследования. Простые методы окраски. Негативные методы окраски.

2.1. Микроскоп

Микроскоп (от греческих слов micros — малый, skopeo — смотрю) — оптический прибор для изучения малых объектов, недоступных невооруженному глазу. В **сложном** микроскопе (простым микроскопом называют лупу) различают механическую и оптическую часть.

Механическая часть микроскопа представлена штативом (рис. 2), коробки с механизмом, предметного столика, тубусодержателя, моно-, бинакулярной насадки, револьвера объектива. Для перемещения тубуса микроскоп снабжен макровинтом и микровинтом для тонкой фокусировки. Верхняя часть тубусодержателя заканчивается головкой, служащей для прикрепления револьвера и тубуса.

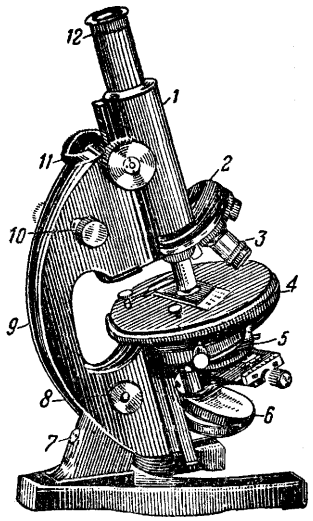


Рис. 2. Микроскоп.
1 — тубус; *2* — револьвер; *3*—объектив; *4* — предметный столик; *5* — осветительный аппарат (конденсор); *6* — зеркало; *7* — ножка; *8* — шарнир; *9* — колонка; *10* — микрометрический винт; *11* — макрометрический винт; *12* — окуляр.

В тубус микроскопа сверху вставлен о к у л я р *(12),* а в нижней части он снабжен вращающимся по кругу “револьвером” *(2),* в отверстия которого ввинчиваются объективы (3). Вращая револьвер, можно подвести под отверстие тубуса любой объектив, который с помощью особой пружинки закрепляется на месте. Большинство объективов дает наилучшее изображение при *длине тубуса в 160 мм.* Тубус передвигается вверх и вниз с помощью двух систем: для грубого передвижения служит зубчатка, или кремальера, приводимая в движение макрометрическим винтом *(11):* им пользуются при слабых увеличениях, а также при сильных объективах для первоначальной грубой установки. Для более точной установки служит микрометрический винт *{10}*, полный поворот которого передвигает трубу микроскопа на 0,1 мм. Микрометрический винт является одной из наиболее хрупких частей микроскопа, и обращение с ним требует особой осторожности. Передвигая тубус при помощи этих двух винтов, его устанавливают так, чтобы получить наиболее

ясную микроскопическую картину; это достигается, когда расстояние от рассматриваемого объекта до объектива равно фокусному расстоянию этого объектива.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объективов и окуляров.

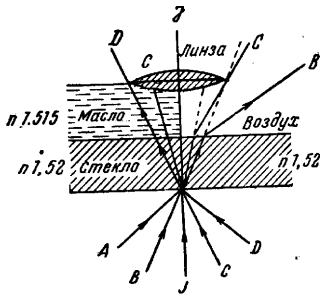
Осветительный аппарат находится под предметным столиком и состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. *Зеркало {6}* служит для отражения световых лучей по направлению к объективу и, через него, внутрь микроскопа. Одна сторона зеркала плоская, другая вогнутая. При дневном свете пользуются плоским зеркалом, при искусственном освещении — вогнутым. *Конденсор* (5) состоит из системы сильных линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от зеркала, в одной точке — фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата. При микроскопии с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика; при искусственном освещении конденсор опускают до тех пор, пока при милом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

Объем лучей сообразно с потребностями исследования регулируется диафрагмой, находящейся под конденсором, которая при помощи рычага может суживаться и расширяться наподобие зрачка глаза (отсюда название ирис-диафрагма). Окрашенные препараты рассматриваются при совершенно открытой диафрагме; при рассматривании неокрашенных объектов следует сузить отверстие диафрагмы, причем приходится тем сильнее закрывать его, чем нежнее структура изучаемого объекта.

Объективы составляют самую важную и наиболее ценную часть микроскопа. Каждый из них представляет собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза самая маленькая, является главнейшей, производящей увеличение. Лежащие за ней линзы называются коррекционными, так как они предназначены для устранения недостатков оптического изображения.

В современных микроскопах новейших систем на оправе объективов обозначается даваемое ими увеличение, например: X8, X40, X90.

Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния, а следовательно, и от кривизны фронтальной линзы. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива.



Все объективы разделяются на сухие и иммерсионные, или погруженные. Сухим называют такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. При микроскопии световые лучи, идущие от зеркала проходят через конденсор в объектив через неоднородные среды, с разными показателями преломления. Так, из воздуха (показатель преломления 1,0), пучок световых лучей попадает в стекло (показатель преломления -1,52) затем опять через воздух и во фронтальную линзу объектива. При каждом переходе часть лучей преломляясь на границе разнородных сред, отклоняется в сторону и не попадает в объектив. В результате поле зрения освещается недостаточно.

При исследовании микробов применяется исключительно иммерсионная, или погруженная, система (объектив). Ее преимущество перед сухими объективами состоит в том, что между стеклом и фронтальной линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата — масло — стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя своего направления, попадают в объектив, чем я достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этого обычно пользуются кедровым маслом, показатель преломления которого почти равен показателю преломления стекла. При этом капля масла помещается на стекло препарата и в нее погружается иммерсионный объектив. Иммерсионные системы имеют у нижнего края ободок: белый – водная иммерсия, темный – масляная. У объективов сухих систем ободка нет.

На оправе объектива указано его собственное увеличение и значение числовой

апертуры – определяется произведением синуса половины отверстного угла на показатель преломления среды, заключенной между фронтальной линзой объектива и препаратом. Числовая апертура сухих систем не может быть выше 0,95. для того, чтобы её повысить, объектив и конденсор погружают в среду, показатель преломления которой больше показателя преломления воздуха (масло, вода). Т. о. конденсор, жидкость, препарат, жидкость и объектив представляют собой единую систему, не вызывающую отклонения светового луча.

Окуляры имеют две линзы: верхняя линза называется Глазной, нижняя — собирательной. Расстояние между линзами, равно полусумме их фокусных расстояний. Таким образом, по длине окуляра можно приблизительно определить общее фокусное расстояние. А так как с уменьшением фокусного расстояния повышается увеличение окуляра, то более сильными будут короткие окуляры, а более слабыми — длинные. Окуляры с наименьшим увеличением обозначают цифрами 1, 2, средние — 3—4; сильно увеличивающий окуляр 5 не дает хороших изображений и потому употребляется редко. В настоящее время обозначают окуляры по тому увеличению, которые они дают, например: Х5, Х7, Х10, Х12, Х15.

Следует иметь в виду, что окуляр дает только увеличение, ничего не добавляя в деталях изображения, которые раскрывает только объектив.

Угол резкого зрения - величина угла, при котором глаз способен различить две раздельные точки.

Общее увеличение микроскопа равняется произведению из увеличения объектива на увеличение окуляра. Таким образом, например, комбинация иммерсионного объектива с показателем увеличения Х90 и окуляром ХI0 дает увеличение объекта в 900 раз и т. д. Микроскопы, употребляемые в повседневной работе, дают увеличение порядка 700—900. При пользовании этими микроскопами пределом видимости являются объекты размером не меньше 0,2 мкм.

Ход лучей в микроскопе. Пучок света, отраженный зеркалом, через диафрагму попадает в конденсор, преломляется в его линзах и лучи попадают на препарат в виде конуса, вершина которого обращена к препарату. Пройдя сквозь препарат, лучи вновь расходятся в виде конуса и попадают в объектив. Преломившись в линзах объектива, лучи на выходе из него дают увеличенное, но обратное изображение. Изображение строится лучами на некотором расстоянии от задней линзы объектива, на уровне диафрагмы окуляра, из окуляра лучи проходят в глаз и на сетчатке возникает мнимое увеличенное обратное изображение.

Порядок работы с микроскопом (по Келеру).

1. Проверить состояние микроскопа: поднять конденсор, открыть его диафрагму, поставить плоское зеркало;
2. Глядя в окуляр и вращая зеркалом, произвести установку освещения;
3. Положить на столик препарат, поставить сухой объектив (8Х) на расстоянии 1 см от препарата;
4. Медленно поднимая тубус макровинтом, добиться резкого изображения препарата. Вращая зеркало, добиться наиболее светлого освещения препарата;
5. Приподнять тубус, на мазок нанести каплю иммерсионного масла;
6. Повернуть револьвер до метки объектива 90 Х;
7. Под контролем глаза осторожно опустить тубус микроскопа до полного погружения объектива в каплю масла;
8. Глядя в окуляр медленно приподнять тубус микроскопа до появления изображения;
9. Установит фокус при помощи микровинта, вращая его на половину оборота в одну или другую сторону;
10. После просмотра, приподнять тубус, убрать препарат с предметного столика;
11. По окончании работы микроскопа необходимо вытереть масло с иммерсионного объектива и перевести револьвер на малый объектив 8Х.

Современные микроскопы имеют ряд усовершенствований, имеющих целью

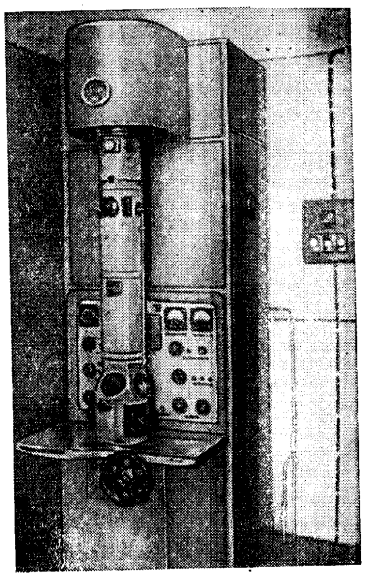
улучшение изображения и расширение границы, видимости. Первое достигается введением в практику микроскопов - бинокуляров, второе — исследованием в темном поле зрения.

Бинокулярный микроскоп является новой моделью, имеющей обычный для микроскопа оптический предел, но обладающей преимуществом в самом процессе микроскопирования. В бинокулярном микроскопе колонка имеет насадку с двумя тубусами, а следовательно, и с двумя окулярами. Таким образом, микроскопирование производится одновременно обоими глазами, не вызывая переутомления органа зрения, неизбежного при пользовании обычным микроскопом с одним окуляром. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, пластичность изображения.

Электронный микроскоп. Как известно, разрешающая способность оптического микроскопа равна 0,2 мкм, т. е. все объекты, размер которых меньше половины длины световой волны (0,00004 см), невидимы даже в самом лучшем оптическом микроскопе, так как полезное увеличение последнего может быть не более 1 000. Вследствие этого производились многочисленные исследования, направленные па создание более совершенного увеличивающего прибора.

В 1932 г. был изобретен электронный микроскоп, в котором вместо световых лучей используется поток электронов. При электронной микроскопии возможно рассматривать объекты, размер которых в 50—100 раз меньше видимых в обыкновенном микроскопе.

Увеличение даваемое лучшим современным электронным микроскопом, равно 20000-40000 раз. При последующем *оптическом увеличении* в 4—5 раз можно получить полезное увеличение в. 100000—200000 раз.



По расположению линз и ходу лучей электронный микроскоп очень похож на проекционный оптический микроскоп. В зависимости от того, из каких линз собран микроскоп, различают электростатические и электромагнитные микроскопы. Источником электронов в этом приборе является электронная пушка (электронно-лучевая трубка с катодом, состоящим из раскаленной нити, и анодом-цилиндром). Вылетевшие из нити электроны разгоняются высоким электрическим напряжением (50 000— 100000 V). Вышедший из электронной пушки пучок электронов попадает в конденсорную электромагнитную линзу, которая сводит их на рассматриваемый предмет, лежащий на тонкой (1/1000000 см) пленке коллодия. После этого лучи попадают на объективную электромагнитную линзу, собирающую расходящиеся лучи и дающую первое (промежуточное) увеличение предмета.

Это изображение можно наблюдать на специальном промежуточном экране. В центре его сделано маленькое отверстие (апертурная диафрагма). Небольшая часть первого увеличенного изображения, равная отверстию промежуточного экрана, служит “предметом” для дальнейшего увеличения. Поток электронов через это отверстие попадает на проекционную электромагнитную линзу, снабженную апертурной диафрагмой. Второе увеличенное изображение, даваемое проекционной линзой, принимается на флюоресцирующий экран или на фотографическую пластинку. Можно прибегнуть также к последующему оптическому увеличению.

С помощью электронной микроскопии удалось получить замечательные результаты в области микробиологии: обнаружить многие важные особенности и детали морфологии микроорганизмов (морфология вирусов и бактериофага и др.).

2.2. Негативные способы окраски препаратов

При этих способах исследуют микробов в неокрашенном виде, в то время как весь фон препарата окрашен каким-либо веществом, которое при приготовлении мазка распределяется на стекле вокруг микробов, но не адсорбируется ими. На окрашенном фоне

неокрашенные тела микробов ярко выделяются, причем контуры их обрисовываются с очень большой точностью.

Способ Бурри

Рис. 10. Мазок из зубного налета (по Бурри).

Исследуемый материал смешивают с тушью, следовательно, микробы рассматриваются на черном фоне. Мазок приготовляют следующим образом: на предметное стекло наносят каплю туши, а рядом с ней — каплю исследуемого материала в дистиллированной воде. Мазок на стекле должен быть слегка мутноватым, так чтобы бактерии лежали в нем одним слоем. Обе капли тщательно, но быстро, чтобы не дать им высохнуть перемешивают; из полученной смешанной капли ребром второго стекла приготовляют мазок таким же способом, как из капли крови. Когда мазок высохнет, на него наносят каплю кедрового масла и рассматривают его с иммерсионной системой: микробные клетки обнаруживаются в виде ярко освещенных телец на темном фоне.

Для ознакомления с техникой окраски по Бурри можно приготовить мазок из зубного налета; где всегда имеется много разнообразных микробов, так как в ротовой полости они находят условия, благоприятствующие их развитию. Мазок приготовляют следующим образом: в каплю воды, помещенную у края предметного стекла, погружают небольшой кусочек зубного налета, взятого простерилизованной и остуженной петлей у шейки зуба, и равномерно эмульгируют его в капле. Затем рядом с каплей воды помещают каплю туши; обе капли тщательно смешивают петлей и из этой смеси делают мазок подобно мазку из капли крови.

При микроскопировании наблюдается характерная флора зубного налета (рис.10).

Вместо туши можно взять 2% раствор колларгола или 3% раствор конгорота, или 10% раствор нигрозина, или 10% раствор опалблау.

Необходимо помнить, что при негативных способах окраски микробы остаются в препаратах неубитыми.

Контрольные вопросы к занятию № 1 «Микроскопические методы исследования».

1. Знакомство с лабораторией.
2. Режим и правила работы в микробиологической лаборатории.
3. Основные приборы и оборудование микробиологической лаборатории.
4. Микроскопы и микроскопическая техника.
5. Правила работы с иммерсионным микроскопом.
6. Морфология микроорганизмов.
7. Микроскопия готовых препаратов.
8. Приготовления мазка зубного налета, окраска его по Бури и микроскопия.

2.3. Структуры бактериальной клетки. Методы их окраски и выявления. Сложные методы окраски. Исследование микробов в окрашенном состоянии

Изучение морфологии микробов в окрашенном состояний является наиболее распространенным в микробиологии методом. Этот метод имеет много достоинств:

1) он позволяет изучить морфологические особенности микробов и дает возможность найти

различия между ними, иногда даже точно определить изучаемый микроорганизм;
2) он удобен в практической работе, так как значительно легче производить исследование, пользуясь убитыми микробами, чем живыми (особенно при изучении патогенных микробов);
3) он весьма доступен благодаря сравнительной простоте техники окрашивания.

Приготовление и окрашивание препарата

Приготовление окрашенного препарата включает:
1) приготовление мазка;
2) высушивание мазка;
3) фиксацию;
4) окраску.

Препараты приготовляются обычно на чистых предметных стеклах. Стекло может быть признано чистым, если помещенная на него капля воды легко расплывается по поверхности, а не принимает шаровидную форму или распадается на отдельные капельки (в этом случае стекло является не обезжиренным).

Очистка стекол производится следующим образом: новые стекла кипятят в 1°/о растворе соды, после чего промывают водой, затем слабой соляной кислотой и вновь водой. Стекла, бывшие в употреблении, сначала помещают на 2 часа в концентрированную серную кислоту (или в смесь 100 частей серной кислоты и 50 частей двухромовокислого калия на 1 000 частей воды), после чего кипятят в щелочи (соде, поташе, едкой щелочи или в золе), а затем основательно промывают водой. Вымытые стекла хранят в склянках с притертой пробкой в 96° спирте или же, вынув из спирта и вытерев досуха, сохраняют сухими в закрытых склянках.

1) Приготовление мазка. Мазок должен быть тонким, так как только при этом условии он удобен для изучения микробов, иметь определенную форму и размеры. Мазок чересчур большого размера требует излишне большого расхода краски. Материал в мазке должен быть распределен равномерно в центре и на периферии, так как равномерное распределение материала значительно облегчает и ускоряет его изучение. Хорошо приготовленный тонкий мазок должен быть размером в 1—2 $см^2$ и иметь круглую или овальную форму.

Для приготовления мазка на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды, рядом наносят культуру, растирают ее на стекле, а затем эмульгируют в капле воды. Если препарат приготовляют *из культуры на плотной среде*, то, соблюдая правила асептики, из пробирки берут петлей немного материала и часть его погружают в каплю, растирают рядом с ней на стекле, затем смешивают с каплей и растирают в ней. Остаток культуры в петле сжигают на пламени горелки. Остудив петлю, приступают к изготовлению мазка: сначала краем петли культуру равномерно размешивают в капле, а затем, положив петлю всей плоскостью, равномерными круговыми движениями распределяют каплю смеси на площади примерно в треть предметного стекла. Если препарат изготовляют *из жидкой питательной среды*, то берут каплю культуры петлей (полное ушко петли) или пастеровской пипеткой и, поместив каплю на середину сухого чистого стекла, равномерно распределяют ее в форме мазка.

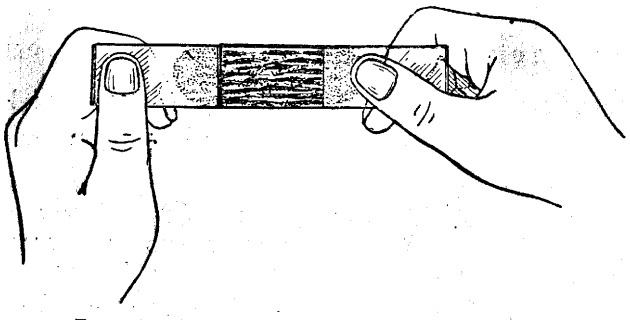


Рис. 6. Приготовление мазка из мокроты.

После приготовления мазка петлю тотчас **же,** не выпуская из рук, прожигают на пламени горелки для стерилизации, а пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Из материала, взятого у больного (гной, мокрота), удобно делать мазки следующим образом: материал прокаленным и остуженным пинцетом или петлей наносят на середину предметного стекла, затем плотно прикрывают его другим предметным стеклом, помещая его так, чтобы осталась свободная левая треть нижнего стекла и правая треть верхнего стекла. Взяв за свободные

концы оба стекла, раздвигают их в стороны обеими руками: получаются два равномерных больших мазка (рис. 6).

Мазок из крови приготовляется иначе. Прикоснувшись предметным стеклом (недалеко от его левого края) к выступившей при уколе капле крови, получают небольшую каплю на стекле и быстро, чтобы не дать крови свернуться, делают мазок следующим образом: стекло кладут на горизонтальную поверхность и придерживают левой рукой; правой рукой к капле придвигают под углом в 45° шлифованное стекло, по краю которого равномерно растекается капля; тотчас же, плотно прижимая шлифованное стекло в том же положении под углом, продвигают его налево по предметному стеклу, получая равномерный мазок.

2) Высушивание. Препарат обычно высушивают при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает равномерно и чрезвычайно быстро. Если же высушивание препарата замедлено, то для ускорения высыхания препарат подогревают, держа стекло мазком вверх, в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки. Это нужно производить крайне осторожно, не допуская перегревания мазка, так как при этом может произойти слишком быстрое и грубое свертывание белков в протоплазме микробов, что нарушит их структуру. Если препарат не полностью высушен, то при фиксации он окажется также испорченным. Если высушиваемые препараты содержат заразный материал, их накрывают стеклянным колпаком, особенно летом, во избежание переноса микробов мухами и порчи самого препарата.

3) Фиксация. Фиксация препарата имеет целью:
1) убить микробов и сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;
2) прикрепить мазок к стеклу, чтобы он не смывался при дальнейших манипуляциях;

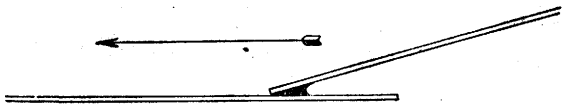


Рис. 7. Приготовление мазка из крови.

3) сделать микробов более восприимчивыми к окраске, так как убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые.

При фиксации следует предупреждать грубые изменения нормальной клеточной структуры и избегать образования ложных структур (артефактов).

Способов фиксации существует много. Наиболее простым, пригодным почти для всех объектов и самым распространенным в микробиологии является *фиксация жаром* — нагреванием на пламени горелки. Этот способ заключается в следующем: препарат берут за край стекла мазком вверх пинцетом и проводят несколько раз через наиболее горячую часть пламени горелки (на границе светлой и темной его части), при этом рука, которая держит препарат, описывает трижды круг диаметром в 0,25 м.

Вся манипуляция занимает 5—6 секунд, причем препарат подвергается при этом действию пламени не более 2 секунд. Быстрота и кратность проведения препарата через пламя регулируются ощущением жжения в пальцах; если препарат хорошо зафиксирован, то стекло при легком прикосновении им тотчас по окончании фиксации к тыльной поверхности левой руки слегка обжигает кожу.

При излишнем перегревании мазок портится, так как сильно изменяется структура клеток; недостаточная же фиксация не достигает цели, так как мазок смывается при доследующей обработке.

В ряде случаев (например, при исследовании мазка крови, при изучении тонких структур клетки простейших и спирохет) фиксация жаром оказывается слишком грубой. Тогда прибегают к *фиксации препарата жидкостями*; при этом фиксатор или наливают на мазок, или препарат погружают в сосуд с фиксирующей жидкостью на определенное время, а затем высушивают. Для этого можно пользоваться одним из следующих способов фиксации:
1) этиловым спиртом 95° в течение 10—15 минут;
2) метиловым спиртом в течение 2—3 минут;
3) ацетоном в течение 5 минут;

4) смесью равных объемов этилового спирта и эфира (смесь Никифорова) в течение 10—15 минут;
5) жидкостью Карнуа – ледяная уксусная кислота 10 мл, хлороформ 30 мл, 96° спирт 60 мм в течение 10 минут.
Можно пользоваться также для фиксации парами осмиевой кислоты или формалина (несколько секунд).

4) Окрашивание мазков. Окрашивание микробов не является механическим процессом проникновения краски в микробную клетку.

Механизм окраски микробов следует рассматривать как процесс физико-химический, как адсорбцию краски микробной клеткой. Соединение микроба с краской является в большинстве случаев весьма стойким, не поддается разрушению или простому вымыванию водой; нередко разные виды микробов по-разному реагируют с одними и теми же красками, что свидетельствует о разнице химического состава их протоплазмы. В ряде случаев различные составные части микробной клетки избирательно окрашиваются различными красящими растворами.

Наиболее пригодными для окраски микробов оказались анилиновые краски, главным образом основные и нейтральные. Кислые краски менее пригодны для этой цели.

Анилиновые краски поступают в продажу в виде сухих порошков, из которых в лабораториях приготовляют растворы. Обычно сначала готовят насыщенные спиртовые растворы, сохраняющиеся впрок, но сами по себе не пригодные для окраски бактерий. Из насыщенных растворов приготовляют разведенные растворы, которые и применяют в повседневной практике.

Окраска мазка производится после фиксации. Если мазок тонкий и трудно определить, на какой стороне стекла он находится, то достаточно подышать на стекло, чтобы мазок явственно выступил, так как вся поверхность стекла, где мазка нет, равномерно запотевает. Можно также слегка поцарапать мазок петлей: от нее должен остаться след.

Количество краски должно быть таким, чтобы покрыть всю поверхность мазка; излишек краски совершенно не нужен как в целях экономии краски, так и потому, что он затрудняет обработку препарата (пачкает пальцы, стекает со стекла и т. д.). Обычно достаточно нескольких капель краски, наливаемых при помощи пипетки. По истечении срока окрашивания краску сливают с препарата и последний промывают легкой струёй воды; при этом со стекла смывается только лишняя краска, краска же, адсорбированная микробами, остается. Оставшуюся на стекле воду осторожно удаляют фильтровальной бумагой, или отсасывая ее краем бумаги, или слегка прижимая кусочек бумаги к мазку. Окрашенный мазок должен быть совершенно сухим, так как остаток воды образует с кедровым маслом, нанесенным на мазок, мутную эмульсию, что мешает микроскопированию.

Способы окрашивания микробов делятся на простые и сложные, или дифференциальные.

Простая окраска позволяет быстро и хорошо ознакомиться с общей морфологией микробов (размеры, форма, взаиморасположение клеток), ввиду чего этот способ применяется в лабораториях чаще всего.

При простой окраске обычно употребляется только одна краска, чаще всего красная — фуксин, или синяя — метиленовая синька.

Фуксин красит быстрее (1—2 минуты) и интенсивнее и окрашивает одинаково все виды бактерий.

Синька красит медленнее (3—5 минут), менее ярко, но препараты получаются более изящными; кроме того, она дает окраску различной интенсивности у разных видов бактерий.

Приготовление красок для простого окрашивания

1. Фуксин. Фуксин (солянокислый, уксуснокислый или сернокислый розанилин, дериват трифенилметана) употребляется в микробиологической практике чаще всего. Он

приготовляется в виде концентрированного карболового раствора — фуксина Циля, очень стойкого и пригодного для окраски в течение многих месяцев. В таком виде он употребляется только для объектов, с трудом воспринимающих окраску (для кислотоупорных бактерий, для спор).

Для окраски большинства бактерий фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой, получая так называемый "разведенный фуксин", или "водный фуксин Пффейфера". Разведенный фуксин очень нестоек и поэтому приготовляется непосредственно перед окрашиванием препарата.

Карболовый фуксин

Фуксин (основной) ..... 1 г
Карболовой кислоты кристаллической 5
Спирт 96° ... . . 10 мл
Глицерин ..... несколько капель
Воды дистиллированной . . . . ., ... 100 мл

Порошок фуксина тщательно растирают и карболовой кислотой в ступке, добавив несколько капель глицерина; во время растирания приливают понемногу спирт. Когда смесь превратится в полужидкую кашицу (без комков приливают понемногу, продолжая все время размешивать, дистиллированную воду). Дают постоять 2 суток, после чего фильтруют.

Водный фуксин

Карболового фуксина 1мл
Дистиллированной воды .....9 мл
Препарат красят 1—2 минуты

2. **Метиленовая синька.** Метиленовая синька (тиазин, тетраметилтионин) приготовляется заранее в насыщенном растворе.
Метиленовой синьки . . . . . 10 г
Спирта 96° ... . 100 мл
Из этого раствора готовят щелочную синьку.
Насыщенного спиртового раствора синьки (профильтрованного) , ... 30 мл
Едкого натра (или едкого кали) 1% .... 1 мл
Дистиллированной воды **.....** 100 мл
Раствор стоек и может долго храниться. Красить 3-5 минут.

2.4. Сложные способы окраски бактерий

Сложные, или дифференциальные, способы окраски бактерий основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для детального изучения структуры клетки (макрокапсулы, жгутики, цитоплазматические включения и т.д.), а также для дифференциации данного микроба от других. Таким образом, сложные способы окраски микробов являются необходимым диагностическим методом в микробиологической практике. При сложном методе окраски используются два и более красителей. Наибольшее практическое значение имеет окраска по **Граму** и окраска по **Цилю- Нильсону.**

Окраска по Граму

Метод окраски по Граму является самым универсальным из сложных способов окраски. Все бактерии по своему отношению к этому методу разделяются на две группы:

красящиеся по Граму — грамположительные, грампозитивные, и не красящиеся — грамотрицательные, грамнегативные. Отношение к окраске по Граму является настолько важным опознавательным признаком бактерий, что обязательно упоминается в их характеристике.

Методика окраски по Граму

Для окраски по Граму требуются следующие растворы.
1. Карболовый генцианвиолет, приготовленный так же, как карболовый фуксин (см. выше, стр. 28).
2. Раствор Люголя (иода кристаллического 1 г, йодистого калия 2 г, воды дистиллированной 300 мл; сначала растворяют в нескольких миллилитрах воды йодистый калий, после чего добавляют кристаллический иод; по растворении смеси прибавляют дистиллированной воды до 300 мл).
3. Спирт 96°.

Механизм окраски по Граму

1. На фиксированный мазок кладут небольшой кусок фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианвиолета на 1—2 минуты.
2. Снимают бумажку, сливают краску и, не промывая водой, наливают на препарат раствор Люголя на 1 минуту (мазок чернеет).
3. Сливают раствор Люголя и действуют на мазок спиртом: или наливают его на мазок на 30 секунд, причем препарат нужно покачивать, или же погружают мазок в стаканчик со спиртом 2—3 раза, пока еще отходят фиолетовые струйки краски.
4. Промывают водой.
5. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 1—2 минут.
6. Сливают краску, промывают водой, обсушивают фильтровальной бумагой, исследуют с иммерсионной системой.

Химизм окраски по Грамму

Грамположительные бактерии, имеющие 6-8 слоев пептитогликана (ПГ) в клеточной стенке, хорошо воспринимают основной краситель (генцианвиолет). Поэтому краситель не вымывается спиртом. Кроме того, Гр (+) бактерии, содержат в КС магниевую соль РНК, которая образует комплекс с йодом и основным красителем. Этот комплекс не разрушается под действием спирта и бактерии сохраняют фиолетовый цвет. Гр (-) бактерии не способны удержать основной краситель, т.к. имеют 1-2 слоя пептитогликана и не содержат магниевой соли РНК. Под действием спирта краситель вымывается, клетка обесцвечивается и окрашивается дополнительным красителем (фуксином) в красный цвет.

Удобной модификацией является способ **Синева**, при котором пользуются заранее приготовленными полосками фильтровальной бумаги, пропитанной краской генцианвиолет и затем высушенной. Эти полоски кладут на фиксированный манок, на который предварительно наносят 2—3 капли воды и в остальном техника окраски аналогична оригинальному способу Грама. При правильной окраске **грамположительные** микробы окрашиваются генцианвиолетом в темный **сине-фиолетовый цвет**, **грамотрицательные**—в дополнительный **красный** цвет фуксином. Чтобы получить правильную окраску, рекомендуется употреблять для окраски по Граму свежие (суточные) культуры микробов; старые культуры дают непостоянные результаты окраски.

Для изучения метода Грама берут смесь бактерий, красящихся и не красящихся по Граму, например, стафилококк и вибрион Мечникова, кишечная палочка и Baccillus anthracoides.

Приготовление мазка. На середину предметного стекла наносят рядом две капли воды; в

одну каплю вносят небольшое количество культуры стафилококка, в другую — культуры вибриона. В каждой капле краем петли равномерно размешивают культуру, затем всей плоскостью петли смешивают равномерно обе капли в форме обычного мазка. Мазок высушивают, фиксируют и красят. Грамположительные стафилококки окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные вибрионы — в красный цвет — они обесцвечиваются спиртом и воспринимают дополнительную окраску фуксином.

Отношения различных видов бактерий к способу окраски по Грамму

Грамположительные Гр(+):
1. Все кокки, кроме нейссерий (менингококки, гонококки);
2. Палочки не образующие спор – бацилла Леффлера (BL)- палочка дифтерии, бацилла Коха (ВК) – палочка туберкулеза, палочка проказы;
3. Все спорообразующие палочка – бациллы и клостридии.

Грамотрицательные:
1.Из кокков – нейссерии (гонококки, менингококки);
2. Все не споровые палочки, кроме трех форм указанных в Гр(+);
3. Все извитые формы.

Окраска кислотоустойчивых бактерий

Кислотоустойчивость микробной клетки связана с особым химическим составом ее клеточной стенки (КС) – имеет большое количество липидов (жирных кислот, глико - и фосфолипидов, восков). КС кислотоустойчивых бактерий имеет очень низкую проницаемость и поэтому плохо окрашивается красителями. Поэтому приходится действовать сильными, концентрированными растворами красок с применение агентов (карболовая кислота) и подогреванием (**протравливание**). Раствор карболовой кислоты разрыхляет КС и повышает её тинкториальные свойства. Высокая концентрация красителя и нагревание усиливает взаимодействие красителя с КС, которая окрашивается в красный цвет. При последующем воздействии кислот некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и докрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые остаются окрашенными фуксином в красный цвет. Из патогенных бактерий кислотоустойчивостью обладает туберкулезная палочка и палочка проказы (рис. 82 и 83).

Основным способом окраски кислотоустойчивых бактерий является способ Циль-Нильсена. Именно этим способом пользуются для обнаружения кислотоустойчивых туберкулезных палочек в мокроте туберкулезных больных.

Способ Циль-Нильсена

1. На фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги (величиной не больше предметного стекла) и наливают карболовый фуксин Циля (или накладывают заранее заготовленную пропитанную неразведенным фуксином и высушенную бумажку, предварительно нанеся на мазок 2—3 капли воды).
2. Мазок с краской 2—3 раза подогревают, держа высоко над пламенем горелки до трехкратного появления паров и каждый раз отставляя препарат в сторону до охлаждения (наблюдать за появлением паров, глядя на мазок сбоку, а не сверху).
3. Дают препарату остыть, снимают бумажку, сливают краску, промывают препарат водой.
4. Обесцвечивают препарат 5% серной кислотой (погружают в стаканчик с кислотой 2—3

раза, не задерживая в кислоте).
5. Препарат тщательно промывают водой.
6. Докрашивают препарат метиленовой синькой 3—5 минут. Кислотоустойчивые бактерии — рубиново - красные, остальные составные части мазка, в том числе форменные элементы и некислотоустойчивые бактерии, — синие (рис. 82—83).

Прижизненная окраска микробов

Прижизненной (витальной) окраской называется такая, при которой клетки микробов прокрашиваются в живом состояния.

Для прижизненной окраски микробов применяют наименее ядовитые краски (метиленовая синька, нейтральная красная, везувин) в малых концентрациях (от 0,1 до 0,001%).

Одним из простых способов является следующий: на чистое предметное стекло наливают насыщенный водный раствор метиленовой синьки, дают ему высохнуть и затем чистой сухой тряпочкой (или фильтровальной бумагой) протирают стекло, пока налет краски на нем не примет светло- голубого оттенка. Затем на стекло наносят каплю исследуемого материала и накрывают ее покровным стеклом. При микроскопировании можно видеть, как микробы постепенно окрашиваются в голубой цвет, оставаясь живыми (например, не теряя своей подвижности).

Можно воспользоваться более грубым способом: каплю исследуемого материала смешивают на предметном стекле с краской (0,1—0,01%), накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом.

Вид – совокупность микроорганизмов, имеющих общий корень происхождения, сходный генотип и максимально близкие фенотипические признаки и свойства (А.И. Коротяев).

Чистая культура – популяция бактерий одного вида или одной разновидности. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных и биохимических признаков, по совокупности которых и определяется видовая принадлежность исследуемого организма.

Штамм – культуры микроорганизма одного и ого же вида, или биовара, выделенные из различных источников или в разное время из одного и того же источника.

Биовар – один вид бактерий подразделяется по одному признаку на биологические варианты. Подразделение на биохимические признаки – **хемовары**, по серологическим свойствам (антигенной структуре) – **серовары**, по чувствительности к фагу – **фаговары.**

Колония – видимое изолированное скопление особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения одной бактериальной клетки на плотной питательной среде.

Признаки, применяемые для идентификации микроорганизмов

Морфологические – форма, величина и характер расположения микробов к друг другу. Изучают при микроскопии мазков и нативных препаратов.

Тинкториальные – способность микробов окрашиваться различными красителями.

Культуральные – особенности роста микробов на жидких и плотных питательных средах.

Биохимические – способность микроорганизмов проявлять сахаролитические и протеолитические свойства с образованием характерных конечных продуктов, т.е. изучение их ферментативной активности.

Антигенные – особенности химического состава микробных клеток (антигенной структуры). Выявляются с помощью специфических дмагностических иммунных сывороток.

Чувствительность к специфическим фагам – способность бактерий лизироваться специфическими бактериофагами.

Биологические свойства – способность продуцировать токсины, ферменты, бактериоцины.

Контрольные вопросы к занятию № 2 «Строение бактериальной клетки. Простые и сложные методы окраски»

1. Классификация шаровидных микроорганизмов по форме и взаиморасположению.
2. Классификация палочковидных микроорганизмов по форме и взаиморасположению.
3. Классификация извитых микроорганизмов по форме и взаиморасположению.
4. Классификация бактерий по спорообразованию.
5. Ход лучей в микроскопе.
6. Порядок работы с микроскопом.
7. Простые методы окраски, их информативность.
8. Сложные методы окраски, их информативность.
9. Негативные способы окраски (по Бури).
10. Химизм и механизм окраски по Граму.
11. Химизм и механизм окраски кислотоустойчивых бактерий по Цилю- Нильсону.
12. Классификация бактерий по окраске по Грамму (Грам (+) и Грамм (-)).
13. Приготовление препаратов, высушивание.

Способы фиксации препаратов.

3. Строение бактериальной клетки. Изучение структуры бактериальной клетки

Изучение структуры бактериальной клетки связано с большими трудностями, обусловленными как малой величиной этих организмов, так и своеобразием их строения. Поэтому при изучении морфологии бактериальной клетки до сих пор остается ряд неразрешенных вопросов, а те из них, которые считаются разрешенными, часто нуждаются в специальных доказательствах. Все же, несмотря на трудность изучения и примитивность морфологической организации бактерий, в настоящее время представляется возможным утверждать, что основные элементы строения бактериальной клетки таковы же, как и у других клеток: оболочка, протоплазма, ядерная субстанция, однако, они имеют много своеобразных отличий в сравнении с высшими организмами.

3.1. Ядерная субстанция бактерий

В настоящее время при помощи химических реакций установлено наличие ядерной хроматиновой субстанции в бактериальных клетках. Однако попытки обнаружить оформленное ядро у бактерий оказываются безуспешными. Большинство исследователей считает, что ядро, морфологически отличающееся от цитоплазмы, у бактерий отсутствует, однако имеется эквивалент ядра в виде мелко раздробленных зернышек хроматина, рассеянных по всей протоплазме бактерий и не обнаруживаемых в таком состоянии. В некоторых стадиях развития бактерий, например, при старении или при образовании инволюционных форм, хроматиновые зерна, дифференцируясь от остальной протоплазмы, образуют большие скопления и становятся видимыми при специальных методах обработки.

Ядерная природа этих скоплений несомненна, так как они дают реакции, типичные для тимонуклеиновой кислоты, являющейся принадлежностью хроматина. Такие образования все же не идентичны истинному ядру более высокоорганизованных клеток, характеризующемуся ядерной оболочкой, распределением хроматиновых нитей и истинным делением (митотическим или амитотическим).

Обнаружение ядерной субстанции у бактерий, как указывалось, требует применения специальной обработки, например, по способу Фельгена или по Романовскому-Гимза.

При обработке препарата по способу Фельгена получается специфичное для хроматина нуклеальное окрашивание. Сущность этого метода заключается в том, что при осторожном гидролизе (при помощи соляной кислоты) специфичной для ядерной

субстанции тимонуклеиновой кислоты освобождаются альдегиды, дающие с фуксинсернистой кислотой, фиолетовое окрашивание.

3.2. Протоплазма бактерий. Включения.

Протоплазма у патогенных бактерий однородна в своей, массе и поэтому окрашивается равномерно. Однако в протоплазме некоторых бактерий образуются отложения запасных питательных веществ в виде компактных зерен – жиров, гликогена и волютина, отличающихся по своему составу от протоплазмы и поэтому окрашивающихся иначе. Эти зерна, или включения, хорошо обнаруживаются, например, у Corynebacterium diphtheriae, где они носят название зерен Бабеш-Эрнста, или зерен волютина (по аналогии с такими же зернами у Spirillum volutans). С целью обнаружения зерен волютина чаще всего пользуются способом окраски по Нейссеру.

Окраска зерен волютина

Способ Нейссера

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синькой Нейссера 5 минут;
2. Промывают водой.
3. Обрабатывают раствором Люголя 20—30 секунд.
4. Не промывая водой, докрашивают везувином 10—15 секунд.
5. Промывают водой, высушивают, исследуют с имерсионной системой.

Зерна волютина представляют собой включения метаполифосфатов, имеющие в отличие от цитоплазмы щелочную реакцию. И поэтому избирательно воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в темно- фиолетовый, почти черный цвет (рис. 11). Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель везувин и окрашивается в соломенно- желтый цвет.

Приготовление красок

1. Уксуснокислая синька Нейссера
Метиленовой синьки ...**0,1 г**
Спирта 96° .... 2 мл
Крепкой уксусной **кислоты .... 5** мл
Дестиллированной воды . . . . . 100 мл

2. Везувин
Везувина . . . . . 2 г
Спирта 96° . . . . 60 мл
Дистиллированной воды ..... 40 ”
Смесь кипятят, по охлаждении фильтруют

Окраска метиленовым синим по Леффлеру

Мазок окрашивают щелочным раствором метиленового синего Леффлера в течение 2-3 минут. В мазке – синие палочки с более темным (почти черным) окрашивание концов. Видна неравномерность окраски тела клетки (исчерченность) и более сильное окрашивание зерен волютина, которые имеют колбовидное вздутие на концах палочки.

3.2. Оболочка бактерий

Оболочка у бактерий настолько тонка, что она обычно не обнаруживается при простых способах исследования. Однако, даже не видя ее, можно утверждать ее существование у бактерий, так как они не имели бы определенной, присущей им формы,

если бы были лишены оболочки: не будучи заключена в оболочку, как в футляр, протоплазма бактерий растекалась бы и они становились бы бесформенными. В важнейших процессах обмена веществ у бактерий (питание) оболочке принадлежит существеннейшая роль.

Наличие оболочки у бактерий доказано явлением плазмолиза: при помещении бактерий в насыщенные растворы (сахара, поваренной соли) протоплазма их обезвоживается, сморщивается и отслаивается от оболочки, становящейся видимой; оболочки видны также у отмирающих бактерий, когда они аутолизируются и при окраске от них остаются так называемые “тени”.

При микроскопировании бактерий в живом состоянии иногда удается обнаружить оболочку в виде блестящей каемки по периферии клетки благодаря разному преломлению лучей в оболочке и протоплазме, что и свидетельствует о разнице в их физико-химическом состоянии. У бактерий оболочка видна хорошо в электронном микроскопе, но у наиболее крупных из них она обнаруживается и при обычном рассматривании с иммерсионной системой и затемненным полем зрения (при опущенном конденсоре и суженной диафрагме).

У ряда бактерий оболочка в некоторых условиях переходит в капсулу, богатую водой и слабо преломляющую свет. Капсула, таким образом, является видоизмененной оболочкой, ослизненной и разбухшей. Бактерии-сапрофиты способны образовать капсулу на сахарных средах, синтезируя сахар питательной среды в полисахарид, откладывая его толстым слоем, диаметр которого во много раз превосходит диаметр тела самого микроба (Leuconostoc mesenterioides и др.).

Патогенные бактерии (например, пневмококк, палочка сибирской язвы) способны образовать капсулу, только находясь в организме человека или животного. Капсулообразование у патогенных бактерий является выражением их защитной реакции. Будучи окружены капсулой, они слабее фагоцитируются и устойчивы к действию антител.

Патогенные “капсульные” бактерии (бактерия Фридлендера, палочки риносклеромы и озены) образуют капсулу и в организме больного, и на питательной среде, где они дают характерный для них слизистый рост культуры.

В мазках из органов капсула ясно различается при любом способе окрашивания, так как она либо совсем не окрашивается, либо окрашивается иначе, нежели тело микроба; оба эти явления свидетельствуют о разнице в физико-химической структуре капсулы и протоплазмы бактерий.

Хорошими объектами для изучения капсулы могут служить бактерия Фридлендера в чистой культуре, Clostridium perfringens, Bacillus anthracis и пневмококк мазках из органов животных, погибших при заражении указанными микробами. Можно рекомендовать окрасить мазок с C. perfringens по Граму, а с пневмококком — фуксином. Наиболее демонстративно капсула выявляется при специальных методах окраски.

3.3. Способы выявления капсулы

Простая окраска

При окраске разведенным фуксином мазка из органов зараженного животного (погибшего, например, от заражения сибиреязвенными палочками или пневмококками), капсула обнаруживается в виде неокрашенной каймы вокруг окрашенного тела микроба, т.к. капсула не воспринимает анилиновые красители.

При окраске метиленовой синькой капсула или не окрашивается, или окрашивается в розовый цвет (при употреблении давно приготовленного раствора синьки), облекая тело микроба, окрасившееся в синий цвет.

Способ Бури- Гинса

Из взвеси капсульного микроба (палочка Фридлендера, палочки клебсиеллы пневмонии) приготовляют тушевой препарат по Бурри, фиксируют его на пламени и окрашивают фуксином в разведении 1:3 или сафранином. Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными на темно- коричневом фоне препарата.

3.4. Споры

Для многих бактерий является характерным образование внутри их тела, посередине или на одном из концов (рис. 15), эндогенной споры круглой или овальной формы. Споры образуются при неблагоприятных внешних условиях существования бактерий (недостаток питательных веществ, неблагоприятная температура, наличие вредных продуктов обмена, высыхание). По мере образования споры клетка, которая произвела ее, постепенно отмирает; но спора в благоприятных условиях вновь прорастает в вегетативную форму. Спорообразование, таким образом, является переходом бактерии в другую форму существования. Спора является защитным приспособлением для сохранения вида в измененных условиях среды. Спора чрезвычайно стойка, что обусловливается ее физико-химическим составом, отличающимся от вегетативной формы бактерий. Протоплазма спор сгущена, оболочка уплотнена и малопроницаема.

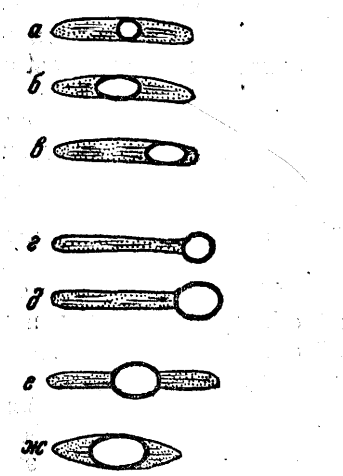


Рис. 15. Образование спор у бактерий (схема).

Рис. 16. Начальная стадия спорообразования (электронная микроскопия)

В связи с указанными особенностями споры при обычном окрашивании не адсорбируют краску и требуют специальных способов окраски.

Спорообразование присуще бактериям, но не коккам и спириллам. Примером спорообразующих патогенных бактерий может быть палочка сибирской язвы (B. anthracis, рис. 16), образующая овальную спору посередине клетки, и палочка столбняка (Clostridium . tetani) с круглой спорой на конце.

Окраска спор

Споры с трудом вступают в физико-химические реакции с различными веществами, в том числе и с красками. При обычных способах окрашивания они не прокрашиваются, оставаясь совершенно бесцветными внутри окрасившихся вегетативных тел бактерий, что позволяет обнаружить расположение, величину и форму споры. Для окраски спор требуется специальная обработка мазка или в виде предварительного прогревания в кислоте для размягчения оболочки, или “протравливания” и воздействия концентрированных растворов красок при высокой температуре. При этом споры прочно адсорбируют краску, что не обесцвечиваются при последующей обработке кислотой, в то время как вегетативные тела

обесцвечиваются и становятся видимыми только при дополнительном окрашивании контрастной краской.

Способ Ожешки

На правом узком краю предметного стекла делают густой мазок из культуры, просушивают его и, не фиксируя, наливают на него 0,5% раствор соляной кислоты, которая действует в качестве протравы. Подогревают 2 минуты (до появления паров) и сливают кислоту. После этого мазок промывают водой, обсушивают, фиксируют и красят (как и при окраске кислотоустойчивых бактерий) карболовым фуксином Циля через фильтровальную бумагу с подогреванием. Затем препарат обесцвечивают 5% серной кислотой и докрашивают дополнительно метиленовой синькой в течение 3—5 минут: споры, стойко прокрасившиеся фуксином, ярко- красные; вегетативные тела бактерий, обесцветившиеся от фуксина в серной кислоте, окрашены в дополнительный синий цвет.

3.5. Жгутики

Все бактерии подразделяются *на подвижные и неподвижные*. Определение этого свойства бактерий имеет диагностическое значение. Органами движения у бактерий являются жгутики — тонкие эластические нити; длина их иногда в несколько раз больше длины тела самого микроба. По числу жгутиков и их расположению бактерии делятся на
- *монотрихи*, имеющие на конце своего тела один жгутик;
- *лофотрихи* с пучком жгутиков на конце;
- *амфитрихи*, имеющие жгутики на обоих концах;
- *перитрихи*, у которых жгутики расположены вокруг тела (рис. 17). Типичным представителем монотриха является холерный вибрион, перитриха — брюшнотифозная палочка (рис. 18).

Рис. 17. Жгутики у бактерий.

Жгутики настолько тонки, что их не удается видеть при обычных способах микроскопии живых или окрашенных бактерий. Их можно обнаружить только при специальных способах обработки: обычно при помощи протравы достигается разбухание жгутиков и увеличение их размера, благодаря чему они становятся видимыми при микроскопировании. При изготовлении мазка требуется особая осторожность, так как жгутики легко отрываются от тела микроба. Культура должна быть молодой, не более 18—24 часов роста.

Так как методы обнаружения жгутиков трудны, а определение подвижности у бактерий является важным диагностическим признаком, то при повседневной практической работе для определения подвижности пользуются одним из обычных способов наблюдения бактерий в живом состоянии — в раздавленной капле или в висячей капле. При этом следует отличать активную локомоторную подвижность бактерий, свидетельствующую о наличии у них органов движения — невидимых жгутиков, от пассивного молекулярного (броуновского) движения, свойственного всем взвешенным в жидкости мелким частицам (в том числе и бактериям).

Окраска жгутиков

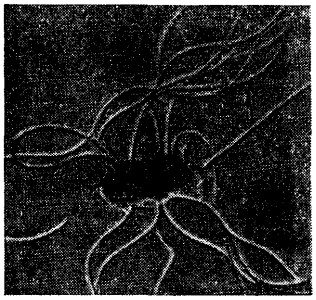


Рис. 18. Жгутики у брюшнотифозной бактерии (электронная микроскопия).

Способ Леффлера

1. Препарат приготавливают из 18—24 часовой культуры следующим образом.

Материал берут поблизости от конденсационной воды, переносят в пробирку с 1—2 мл стерильной водопроводной воды, осторожно погружая его, но не разбалтывая; пробирки выдерживают 30—60 минут при комнатной температуре. Затем взвесь бактерий переносят в каплю воды (не размазывая ее петлей), нанесенную на предметное стекло, н дают высохнуть. Для обеспечения сохранности жгутиков необходимо чрезвычайно осторожное обращение с мазком во время всех манипуляций.

2. Обрабатывают 15—20 минут при комнатной температуре протравой следующего состава: 1 мл насыщенного спиртового раствора фуксина + смесь из 10 мл 25% водного раствора танина с 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа (протраву готовят за несколько суток до употребления; перед употреблением ее отфильтровывают).

3. Тщательно промывают водой, высушивают на воздухе.

4. Докрашивают фуксином Циля 3—4 минуты при легком подогревании (без отхождения паров).

5. Промывают водой, высушивают (над огнем).

Способ Бининьетти

Готовят 3 раствора за 2-3 дня до окраски.

1. сульфат цинка 1г
   танин 15г
   дистиллированная вода 100 мл
2. насыщенный горячий водный раствор квасцов
3. насыщенный спиртовой раствор генцианвиолетового.

Непосредственно перед окраской 1, 2 и 3 растворы смешивают в пропорции 5:5:3. Наливают на фиксированный мазок смешанную краску и над пламенем подогревают 2-3 минуты до появления паров. Промывают водой и просушивают. Рассматривают с иммерсионной системой.

3.6. Исследование микробов в живом состоянии

Метод изучения микробов в живом, не окрашенном состоянии имеет то преимущество, что микробы изучаются в неповрежденном виде, тогда как обработка препарата при его окрашивании приводит нередко к частичному изменению микробных клеток под влиянием высушивания или воздействия красящих веществ.

Преимуществом этого метода является и то, что наблюдение микробов в живом виде позволяет выявить ряд свойств, не обнаруживаемых у убитых микробов, например, их активную подвижность и др.

Вместе с тем метод имеет и ряд недостатков, как, например, трудность исследования неокрашенных микробов ввиду их малой величины, невозможность длительно сосредоточить внимание, на микробе, так как он быстро перемещается из поля зрения (как при активной его подвижности, так и в силу молекулярного перемещения в жидкости. Обращение с живыми патогенными микробами требует исключительной осторожности и навыка (обязательное погружение мазка в дезинфицирующий раствор после микроскопии и т. д.).

В живом состоянии микробов исследуют в “р а з д а в.л е н н о й” или в “в и с я ч е й” капле; в некоторых случаях при этом применяют прижизненную (витальную) окраску,

микробов. Раздавленную или висячую каплю микроскопируют с помощью сильных сухих систем или с иммерсионной системой в затемненном поле зрения — при суженной диафрагме и опущенном конденсоре.

Лучше же всего их микроскопировать в микроскопе с темным полем зрения.

“Раздавленная” капля

На середину предметного стекла наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала; эту каплю накрывают покровным стеклом, осторожно накладывая его пинцетом, чтобы в жидкости не образовалось пузырьков воздуха. Удачно сделанная капля заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, но при этом жидкость не выступает за, края покровного стекла. Если требуется рассматривать препарат продолжительное время, то края покровного стекла предварительно смазывают вазелином.

«Висячая» капля

Каплю исследуемого материала наносят на середину обезжиренного покровного стекла. На него накладывают предметное стекло с углублением (лункой) в середине так, чтобы капля находилась в центре лунки. Препарат быстро поворачивают каплей вниз и капля должна свободно свисать в углубление, не соприкасаясь с его дном и краями (рис. 19). Края выемки на предметном стекле следует предварительно смазать вазелином; таким образом, капля оказывается герметически закрытой во влажной камере и защищенной от высыхания. Используют объектив малого увеличения (8 или 10), находят край капли, а затем устанавливают объектив 40 или 90.

Если исследованию подвергается плотный материал, то его предварительно эмульгируют в физиологическом растворе в стерильном часовом стекле, откуда затем и берут часть материала для приготовления висячей капли.

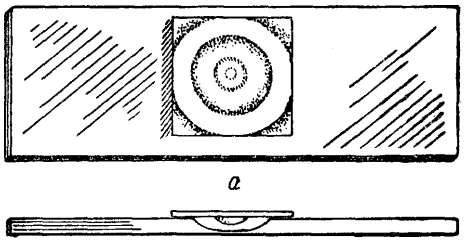


Рис. 19. «Висячая» капля.
а — вид сверху; *б* — вид сбоку.

Исследование в темном поле

Микроскоп с темным полем зрения отличается от обычного микроскопа способом освещения препарата. В обыкновенном микроскопе исследуемый объект рассматривается в проходящем свете, а в данном случае применяется яркое боковое освещение, вследствие чего получается изображение светящегося объекта на темном фоне. При этом косые лучи не попадают в объектив и, следовательно, в глаз наблюдателя, в силу чего поле зрения оказывается совершенно неосвещенным (темное поле зрения). В глаз наблюдателя попадают только лучи, натолкнувшиеся на своем пути на исследуемый объект и отраженные от него (лучи, претерпевшие в объекте дифракацию) (рис. 20). Это явление подобно тому, которое приходится наблюдать, когда в косых лучах солнца, проникающих через щель, видны движущиеся пылинки, совершенно невидимые при обычном освещении.

Такое боковое освещение в микроскопе можно получить разными способами; наиболее универсальным является пользование специальным конденсором с затемнением в центре, пропускающим только боковые косые лучи. Подобное затемнение можно получить при помощи чрезвычайно пустого способа: вкладывания между линзами конденсора кружка черной бумаги с оставлением незначительной периферической части линз.

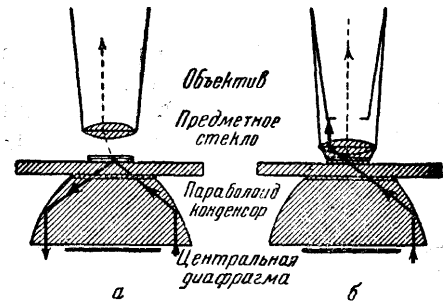


Рис. 20. Ход лучей в микроскопе с темным полем зрения.
а — с сухой системой; *б* — с иммерсионной системой.

Объекты, которые можно наблюдать при помощи метода косого освещения в темном поле зрения, измеряются 0,06—0,04—0,02 мкм, т. е. они лежат за пределами видимости в обычном микроскопе. В то же время и более

крупные объекты в ряде случаев оказываются при пользовании темным полем зрения в более благоприятных условиях для изучения, так, как они лучше видны вследствие контраста между ними и темным полем зрения; весьма удобно пользоваться этим методом и для наблюдения подвижности микробов в живом состоянии.

Техника микроскопии. Каплю исследуемого материала на предметном стекле накрывают покровным стеклом (следить, чтобы не было пузырьков воздуха!). На обе поверхности препарата помещают каплю кедрового масла для того, чтобы проходящие лучи света не преломлялись; микроскопируют с иммерсионной системой. При микроскопии с сухой системой на конденсор наносится капля воды. Таким способом исследуют лептоспиры.

4. Морфология грибков

4.1. Морфология грибков

Грибки (Mycetes) принадлежат к классу низших растений, лишенных хлорофилла. Многочисленные микроскопические грибки представлены как одноклеточными, так и многоклеточными организмами. Так называемые г и ф ы грибков представляют собой тонкие ветвящиеся нити; они собраны в густо переплетенные войлокообразные скопления — мицелий грибка.. Грибки размножаются при помощи спорообразования; в связи с этим среди гиф встречаются так называемые плодоносящие гифы, на концах которых находятся плодовые тела — споры, образованные у различных представителей грибков эндогенным или экзогенным путем (эндоспоры и эктоспоры).

Микроскопические грибки подразделяются на лучистые" нитчатые и дрожжевые.

Лучистые грибки, или актиномицеты (от actis — луч и mycetes—грибы), получили свое название вследствие образования ими лучистых друз (см. ниже) в гною или в тканях больных актиномикозом. Эти микроорганизмы совмещают черты строения бактерий и грибков и поэтому являются как бы переходной группой между ними, причем с бактериями они имеют большую связь, в особенности с ветвящимися. Сходство с бактериями отражено и

в морфологической структуре лучистых грибков: в чистой культуре их гифы представляют собой однородные нити одинакового диаметра, иногда распавшиеся на участки, и тогда их трудно отличить от бактерий (рис. 21).

Оболочка гифы тонка и невидима подобно бактериальной оболочке; вопрос о ядре обстоит так же, как и в отношении ядра бактерий; окрашиваемость лучистых грибков такова же, как и бактерий. Отличием от бактерий является способ размножения спорами — образование "воздушных" спор на конце гифы. У некоторых актиномицетов размножение происходит путем простой фрагментации гифы, и тогда их палочкообразные отрезки неотличимы от бактерийных клеток.

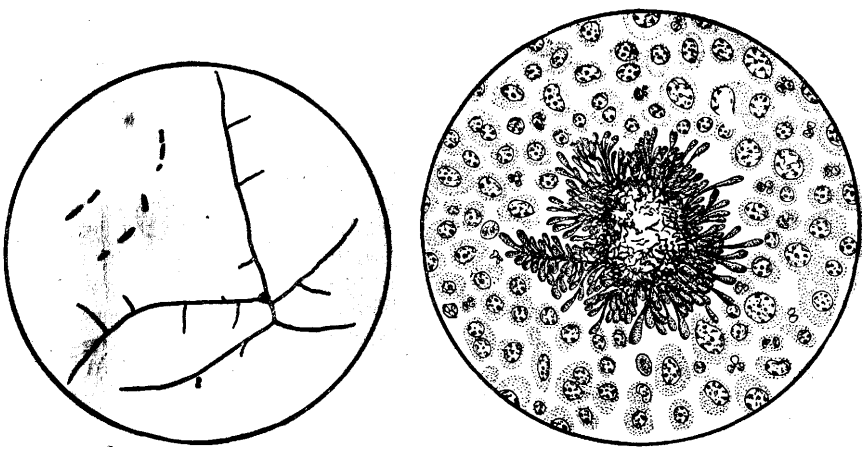


Рис. 21. Лучистый грибок—мазок из чистой культуры.
Рис. 22. Лучистый грибок—друза.

Попадая в организм, патогенные лучистые грибки изменяют свои морфологические свойства: они образуют друзы—густое переплетение гиф в центре с отдельными, отходящими наподобие лучей гифами по периферии (рис. 22). При этом концы гиф, погруженные в ткань, колбовидно вздуты, утолщены (ослизнены) и окрашены в отличающийся от центральной части друзы цвет; это явление, по-видимому, имеет характер защитного приспособления наподобие образования капсулы у бактерий.

Нитчатые грибки имеют гифы, разнообразные по длине и толщине, нередко разделенные перегородками на отдельные клетки; при исследовании их в живом состоянии видна оболочка, одно или несколько ядер, протоплазма с вакуолями и зернами запасного питательного материала. Гифы нитчатых грибков могут иметь различную дифференциацию: нередко они снабжены присосками для прикрепления, сосущими органами для питания и т. д. У плодоносящих гиф на концах находятся органы плодоношения с эндо - или экзоспорами. Примером образования эндоспор может быть мукоровая плесень (Mucor corymbifer), имеющая нерасчлененные гифы. Плодоносящая гифа называется спорангиеносцем; на конце ее имеется шарообразное расширение—спорангий, наполненный эндоспорами (рис. 23, *3*).

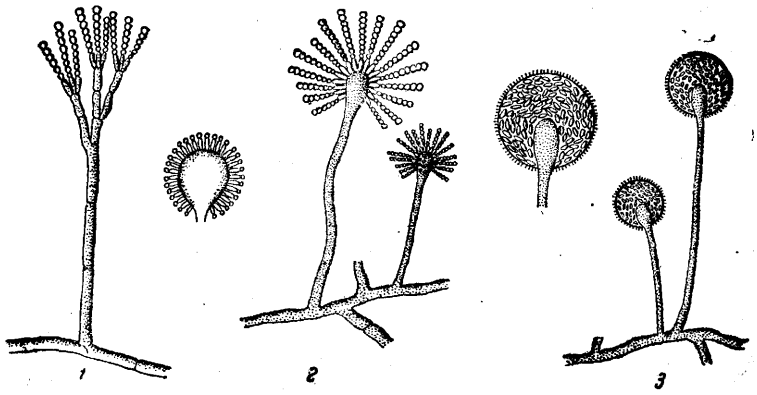


Рис. 23. Нитчатые грибки.
1 — Penicillium; *2* — Aspergillus; *3* — Mucor.

Образование эктоспор можно наблюдать у леечной плесени (Aspergillus): гифы расчленены перегородками; от плодоносящей гифы, носящей наименование конидиеносца, как бы отшнуровываются споры (конидии), располагающиеся по радиусам шара и напоминающие поэтому выливающиеся из лейки струи воды (рис. 23, 2).

У пенициллиума (Penicillium), или кистевика, эктоспоры расположены в виде кисточек (рис. 23, 1).

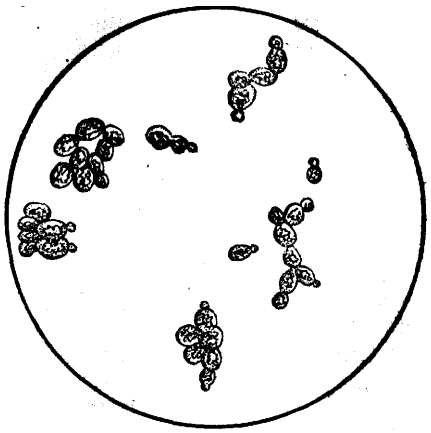


Рис. 24. Дрожжи.

При изготовлении препарата для наблюдения в живом состоянии кусочек плесени нужно очень тщательно расщепить препаровальными иглами в капле воды, тогда будут хорошо видны отдельные гифы; к капле можно прибавить немного фуксина для окрашивания в живом виде. Мазок рассматривают с сухой системой при опущенном конденсоре и суженной диафрагме.

4.2. Дрожжи

Дрожжи — грибы, не образующие мицелия.

Дрожжевая клетка имеет шарообразную или овальную форму, размер ее достигает 8—10 мкм. Она дифференцирована на оболочку, протоплазму и ядро. В протоплазме часто встречаются включения в виде гранул, сильно преломляющих свет, и вакуоли с клеточным соком. Ядро имеет круглую форму (рис. 24).

Дрожжи размножаются путем почкования: на материнской клетке появляется вздутие, дающее начало новой клетке, куда переходит и часть делящегося ядра. Спорообразование у дрожжей наступает обычно после многократного размножения почкованием и при истощении питательной среды.

Строение дрожжевых клеток отчетливо выявляется при микроскопировании их в живом состоянии (раздавленная капля) с сухой системой при опущенном конденсоре и суженной диафрагме. При окраске фиксированных клеток метиленовой синькой сильнее окрашиваются гранулы (зерна волютина) и слабее - протоплазма.

5. Морфология спирохет

Спирохеты представляют собой особую самостоятельную группу микробов, имеющую как свои характерные свойства, так и признаки, общие с бактериями и с простейшими микроорганизмами.

Спирохеты имеют форму нитевидной спирали с различным числом завитков. В отличие от спирилл, имеющих оболочку и передвигающихся с помощью жгутиков, спирохеты лишены оболочки, и поэтому тело их способно активно сокращаться. Таким образом, в живом состоянии у них можно наблюдать оживленные движения — вперед и назад, вращательные вокруг тела или маятникообразно качающиеся. В электронном микроскопе у спирохет обнаружены жгутики, располагающиеся пучком на конце тела спирохеты.

Спирохеты не имеют диференцированного ядра; протоплазма их спиралеобразно обвита вокруг эластической прямой нити (несущей скелетную функцию), обнаруживаемой при специальной обработке.

Патогенные спирохеты принадлежат к трем типам: recurrentis (спирохета возвратного тифа), pallidum (возбудитель сифилиса) и interrogans (возбудитель инфекционной желтухи). По классификации, принятой в ряде современных руководств, спирохеты типа recurrens отнесены к ролу Borellia, типа pallida—к род Treponema**,** типа icterogenes — к роду Leptospira.

Первые из них способны окрашиваться фуксином, остальные требуют специальной окраски. В живом состоянии спирохеты исследуются в темном поле зрения.

Treponema pallidum – число оборотов спирали 8 - 12, завитки равномерные, кверху закругленные. Расстояние между ними одинаковое, высота завитков по направлению к концам уменьшается. Жгутиков нет. Имеют трехслойную наружную стенку и трехслойную цитоплазматическую мембрану. Между ними располагается пучок фибрилл. При неблагоприятных условиях образуют цисты. В организме образует капсулоподобный чехол из мукополисахарида. Чувствительны к пенициллину. Движение – плавное, маятникообразное, сгибательное (в отличии от сапрофитических спирохет –T. macrodenticum) . Диагностика- микроскопирование мазка из твердого шанкра. Окраска: серебрением по Морозову (черно- коричневые), по Романовскому-Гимзе (бледно-розовый цвет), темнопольная микроскопия (вид равномерно освещенной тонкой спирали). При вторичном и третичном сифилисе применяют серодиагностику.

Leptospira interrogans – в живом виде полупрозрачные (слабо переломляют свет). Патогенные и большая группа непатогенных лептоспир морфологически не различаются. Спиралевидные нити, концы крючкообразно загнуты. Завитки мелкие, тесно прилегают друг к другу (на 9 мкм приходится 18 завитков). Движение: прямолинейное, по кругу, вращение на месте, в полужидких средах – змеевидное. Длина – 7- 14 мкн, ширина – 0,07-0,14 мкн. Имеют трехслойную оболочку, тонкую регидную осевую нить и цитоплазматическую спираль, которая равномерными завитками окружает осевую нить. Цитоплазма имеет собственную бесструктурную оболочку. Жгутиков и ундулирующей мембраны нет. Дифференцируются на основные серологические типы, известно 124 серотипа, 18 серогрупп. В СНГ к возбудителям лептоспироза относят 13 основных серогрупп. Диагностика: РМАЛ – реакция микроагглютинации и лизиса. Лептоспиры между собою склеиваются посредством антител, теряют подвижность, может происходить лизис – образование зернистости, распад на фрагменты. Окраска по Р-Г: розово-сереневый цвет.

Borellia recurrentis – возбудитель европейского возвратного тифа, передается через платяную вошь. Извитая лево- и правовращающаяся спираль длиной 15-20 мкм., шириной 0,2-0,3 мкм. имеет 3-10 крупных завитков, неравномерных, с заостренными концами. Имеет пенистую эластичную оболочку и ЦПМ, между которыми лежат 15-20 параллельных фибрилл, обвивающих тело клетки. Нет митохондрий и ундулирующей мембраны. Строгие анаэробы. Движение – толчкообразное, сгибательно- поступательное. Хорошо окрашивается анилиновыми красителями, по Р-Г окрашиваются в сине- фиолетовый цвет, грамотрицательны.

Для изучения морфологии спирохет можно воспользоваться готовыми мазками из крови мышей, зараженных спирохетами возвратного тифа (или от больных возвратным тифом). В окрашенном мазке среди эритроцитов видны тонкие спирохеты имеющие 3—5 крупных завитков; длина тела спирохет15—20 мкм, т. е. превосходит в 2—2,5 раза диаметр эритроцита (рис. 25).

Сходство спирохет с простейшими:
- не имеют регидной оболочки;
- имеют более сложное строение, чем бактерии (осевая нить, микрофибриллы);
- окрашиваются как и простейшие (по Р-Г);
- образуют цисты (покоящиеся формы);
- вызывают заболевания по течению сходные с протозойной инфекцией (возвратный тиф похож на малярию);
- плохо культивируются.

Сходство спирохет с бактериями:
- имеют нуклеоид;
- напоминают спириллы;
- делятся продольно;
- чувствительны к антибиотикам и химиопрепаратам;
- образуют цисты

Окраска по Романовскому - Гимза

Краска Романовского-Гимза — смесь азура (органическая краска, получаемая из метиленовой синьки), эозина и метиленовой синьки. Будучи в растворе сине-фиолетового цвета, она окрашивает клеточную плазму в голубой цвет, а ядра клеток, зернистость, слизь, капсулы бактерий — в красно-фиолетовый цвет. Краска широко применяется в микротехнике, так как позволяет обнаружить различные цитологические детали. Окраска по Романовскому-Гимза является одним из основных методов при изучении морфологии

кровепаразитов, а также при исследовании форменных элементов крови.

Способ применения. К 10 мл дистиллированной воды нейтральной реакции непосредственно перед окраской препарата прибавляют 10 кашель краски и тотчас же наливают на фиксированный препарат (или погружают препарат в стаканчик с краской). Через 1 час краску сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе и исследуют. Если поместить препарат с краской в термостат при 37°, то окрашивание происходит быстрее (30—40 минут).

Результаты окрашивания зависят от свойств воды, поэтому следует проверять ее реакцию (она должна иметь pH=6.8—7,0).

6. Морфология риккетсий

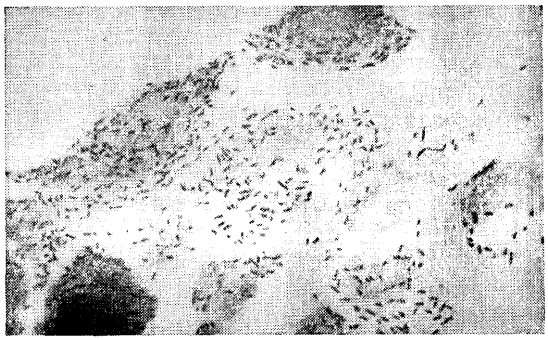


Рис. 30. Риккетсии.

Риккетсиями называют своеобразную группу микроорганизмов, занимающую промежуточное положение между бактериями и вирусами. С бактериями они сходны по своей морфологии: мельчайшие микроорганизмы размером 0,2—0,3X0,3—1 мкм риккетсии имеют кокковидную или бациллярную форму (рис. 30), причем обе эти формы чрезвычайно полиморфны.

По П. Ф. Здродовскому, наблюдаются четыре морфологических типа риккетсии: 1) кокковидные; 2) палочковидные (короткие); 3) бациллярные (длинные, изогнутые); 4) нитевидные.

Внутриклеточное размножение и абсолютный паразитизм сближают риккетсий с фильтрующимися вирусами.

Риккетсии окрашиваются краской Романовского-Гимза в розово-красный цвет. Чрезвычайно удобен и прост способ окраски риккетсий по П. Ф. Здродовскому: препарат тонким слоем наносят на стекло, фиксируют на пламени и окрашивают разведенным карболовым фуксином (10—15 капель фуксина на 10 мл дважды дистиллированной воды) в течение 5 минут;

затем препарат слегка обесцвечивают погружением на 1—3 секунды в слабую (0,01%) соляную кислоту, промывают водой и докрашивают в течение 30 секунд 1 % водной метиленовой синькой. Риккетсий окрашиваются в рубиново-красный цвет, а клеточные элементы в голубой (протоплазма) или синий (ядра) цвет.

Риккетсий являются паразитами различных членистоногих. Среди многочисленных видов риккетсий имеются патогенные для человека и животных. Заражение риккетсиями происходит при посредстве кровососущих членистоногих.

Контрольные вопросы к занятию № 3 «Строение бактериальной клетки. Изучение структур бактериальной клетки»

1. Обязательные и необязательные структуры бактериальной клетки.
2. Капсула. Функции. Способы выявления капсулы.
3. Жгутики. Функции. Окраска жгутиков.
4. Включения. Функции.Окраска зерен волютина.
5. Споры. Функции.Окраска спор.
6. Этапы спорообразования. Проростание споры
7. Микроворсинки. Строение и функции.

8. Клеточная стенка. Функции.
9. Строение пептидогликана клеточной стенки
10. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий.
11. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.
12. Цитоплазматическая мембрана, строение, функции.
13. Периплазматическое пространство, функции.
14. Цитоплазма, её составляюшие.
15. ДНК (нуклеотид, генофор).
16. Рибосомы.
17. Приготовление препаратов «висячая капля» и «раздавленная капля».
18. Морфология спирохет.
19.Строение Treponema pallidum, Leptospira interrogans, Borellia recurrentis
20. Морфология дрожжеподобных грибов
21. Морфология риккетсий.

II. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В отделе “Физиология микроорганизмов” изучаются основные функции микробов - питание, размножение, дыхание, движение; влияние на микробов внешних факторов; различные проявления их химической активности, используемые в лабораторной практике с диагностической целью; различные продукты микробной клетки, обусловливающие их роль в патологических процессах в организме; наконец, своеобразные процессы, как явления антагонизма микробов и феномен бактериофагии.

Изучение физиологических и биохимических свойств микробов, так же как и изучение их морфологии, требует специальной методики исследования, в соответствии с чем в разделе “Физиология микроорганизмов” осваиваются основные и важнейшие методы микробиологической техники: методы выделения чистых культур, методы стерилизации, способы приготовления питательных сред и т. д. Наряду с этим, происходит и ознакомление с аппаратурой, необходимой в микробиологической лаборатории (автоклав, термостат и т. д.).

1. Основные приемы бактериологической техники и аппаратура

1.1. Обращение с бактериальными культурами

В своей научной и практической деятельности микробиолог работает обычно с “чистыми” культурами микробов (рост микробов только одного определенного вида), добиваясь их получения из исследуемого материала, а затем поддерживая рост чистых культур в течение необходимого (иногда длительного) срока. При пересеве их с одной среды на другую или при извлечении части культуры для приготовления мазка необходимо соблюдать условия, обеспечивающие предохранение чистой культуры от загрязнения посторонними микробами. Сохранение Чистоты культуры является основой бактериологической работы, так как только при этом условии возможно точное выявление всех свойств изучаемого микроба (морфологических, биохимических и др.).

Извлекают микробов из пробирки с помощью металлической (предпочтительно платиновой) проволоки в виде петли или иглы (рис. 5). Последняя может быть погружена в пробирку только после стерилизации ее в пламени горелки. При этом петля (или игла) быстро накаливается и так же скоро остывает без повреждения металла. При прокаливании петлю или иглу следует держать в пламени вертикально для того, чтобы проволока на всем протяжении была накалена докрасна. Затем, проведя несколько раз через пламя, стерилизуют и ближайший к проволоке отрезок стеклянной или металлической палочки, в которую

вделана петля.

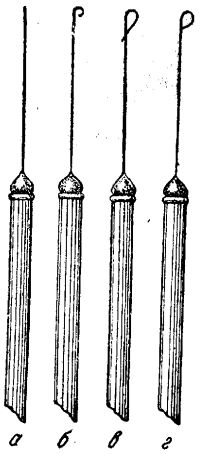


Рис. 5. Игла *(а)* и петля *(б, в, г)* для посевов; *б, в* — петля приготовлена неправильно; *г* — правильно.

Лишь после такой тщательной стерилизации петля может быть внесена в пробирку с культурой. Прикосновение к культуре слишком горячей петли может повредить микробам. Поэтому рекомендуется остудить петлю, предварительно прикоснувшись ею к внутренней поверхности пробирки или же к питательной среде, свободной от бактериального налета (если имеют дело с твердой средой); если проволока недостаточно остыла, то среда при прикосновении петли с треском расплавляется или “кипит”.

Для извлечения культуры с целью приготовления мазка пробирку берут в левую руку между большим и указательным пальцем в почти горизонтальном положении; при этом должна быть хорошо видна вся поверхность питательной среды с культурой бактерий. Простерилизовав петлю, безымянным пальцем и мизинцем правой руки (остальные пальцы правой руки заняты петлей) вынимают из пробирки ватную пробку и так держат ее во время последующих манипуляций; вынув пробку, стерилизуют края пробирки, обжигая их на пламени горелки, затем погружают петлю в пробирку. Остудив петлю, берут ею небольшое количество культуры (избыток культуры излишен) для приготовления мазка, стараясь не захватить при этом питательной среды; вынув петлю, опять обжигают край пробирки, а также слегка обжигают и пробку, после чего ею закрывают пробирку. Не выпуская петли из рук, ставят пробирку в штатив и приступают к приготовлению мазка.

1.2. Пересев чистой культуры на плотные питательные среды

Пересев или перевивка чистых бактериальных культур является наиболее частой манипуляцией в повседневной лабораторной практике. Пересев чистой культуры на свежую питательную среду необходим для сохранения жизнедеятельности микробов, так как при росте они извлекают из среды питательный материал и насыщают ее продуктами собственного обмена, поэтому среда становится непригодной для нормального роста микробов. При исследовании морфологических и биологических свойств микробов также необходимы посевы на свежие среды, так как это и изучение проходится лишь на культурах определенного возраста. Для установления микробиологического диагноза, для ряда практических задач, как, например, приготовление вакцин, также пользуются посевами чистых культур микробов.

Основным непременным условием при посеве является сохранение чистоты культуры, т. е. постоянное сохранение в пробирке только одного вида микробов, без загрязнения его посторонними микробами, что абсолютно недопустимо в бактериологической работе. Для этого необходимо соблюдение всех деталей техники посева, обеспечивающих стерильность. Посевы производятся непосредственно около зажженной горелки, в пламени которой стерилизуется петля, обжигаются края пробирки, когда ее открывают и закрывают, а также и пробки пробирок, вынимаемые при посеве. Следует помнить, что, несмотря на быстроту всех манипуляций, открытые пробирки некоторое время соприкасаются с воздухом, всегда содержащим большое количество микробов. Для того чтобы не внести последних в пробирки, все движения руки при посеве должны быть быстрыми, но точными и осторожными; пробирки следует держать сильно наклоненными, так как в прямом положении в них непосредственно “падали” бы бактерии из воздуха. При посеве нельзя разговаривать, кашлять, так как при этом с мельчайшими капельками слизи выделяются микробы из ротовой полости. В комнате не должно быть колебаний воздуха от хождения других лиц, тем более недопустимо подметание пола во время посевов и даже незадолго до них.

Посевы на плотные среды. Самым частым методом перевивки бактерий является **посев на пробирку с косым агаром.**

Он производится следующим образом.

1. Пробирку с чистой культурой на косом агаре берут в левую руку в наклонно-горизонтальном положении между большим пальцем и первой пястной костью; скошенная поверхность агара повернута к глазам и должна быть вся видна. Рядом с пробиркой с культурой помещают в точно таком же положении пробирку с незасеянной питательной средой. Пробирки держат в таком положении, не выпуская их и не переставляя, во время всей манипуляции посева (рис.8).

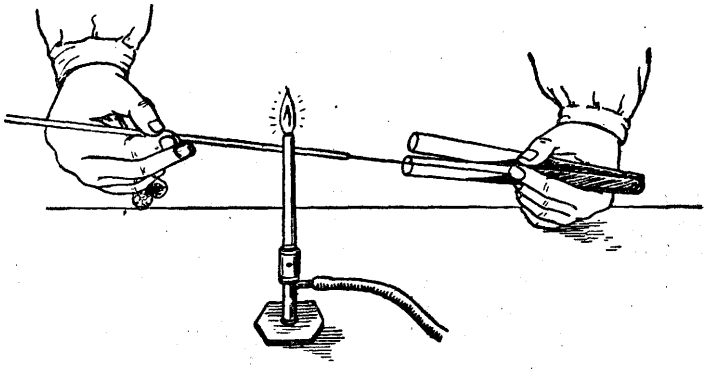


Рис. 8. Пересев из одной пробирки в другую.

2. Взяв в правую руку петледержатель, как писчее перо, прокаливают петлю, держа ее вертикально в пламени горелки, до красного каления, затем быстро проводят через пламя. *2* — 3 раза отрезок петле держателя у петли. Простерилизованную петлю не выпускают из рук до конца посева и следят, чтобы она ни к чему не прикоснулась.

3. Мизинцем правой руки плотно захватывают наружные концы ватных пробок и вынимают пробки из пробирок; при дальнейших манипуляциях следят, чтобы пробки ни к чему не прикоснулись.

Можно держать пробки в левой руке, поместив одну из них между безымянным и средним, а вторую — между средним и указательным пальцем.

4. Обжигают края пробирок на пламени горелки.

5. Вводят петлю в пробирку с культурой; прикоснувшись петлей к участку среды, свободному от посева, убеждаются, что петля остыла (агар не должен “кипеть” под петлей); берут полную петлю культуры.

6. Быстро переносят петлю с взятым материалом в пробирку с питательной средой, не задевая краев и стенок обеих пробирок.

7. Опускают петлю до конденсационной воды, находящейся: у дна пробирки, и делают посев культуры на скошенной поверхности среды одним из трех способов: 1) посев чертой — проводят" петлю по прямой линии по середине питательной среды от конденсационной воды до верхнего края; 2) посев “штрихом” — проводят зигзагообразную линию, скользя: петлей по поверхности среды от одного края пробирки к другому, поднимая штрихи от конденсационной воды до верхушки среды; 3) посев сплошной — растирают материал непрерывными круговыми движениями по всей поверхности питательной среды.

8. Вынимают петлю из пробирки. Быстро обжигают края пробирки и внутренние концы пробок; не туша загоревшихся пробок (не дуть на пробки!), вставляют их в пробирки.

9. Тщательно прокаливают петлю на пламени и ставят ее в штатив.

10. Отставив в сторону пробирку с культурой, но не выпуская из рук вновь засеянной пробирки, надписывают на ней название посеянного микроба и дату посева; только после этого пробирку с посеянным материалом ставят в коробку, которую помещают затем в термостат (чаще всего на сутки).

Примечание. При посеве на плотной среде следить, чтобы не поцарапать ее петлей.

2. Питание микроорганизмов

Питание является важнейшей функцией микроорганизмов. Оно является основой для синтеза в клетке тех сложных веществ (белки, углеводы, жиры), из которых состоит тело микроба. Оно необходимо для роста микроорганизмов и их размножения; путем питания (и особенно дыхания) микроорганизмы приобретают энергию, необходимую для их жизненных процессов.

Акт питания у бактерий осуществляется путем осмоса питательных субстратов через

оболочку, как через полупроницаемую мембрану.

Необходимые для питания микробов вещества весьма разнообразны; однако совершенно обязательно присутствие в них так называемых органогенов — кислорода, водорода, углерода, азота, наличие которых является необходимым для синтеза протоплазмы и для жизнедеятельности микробов. Типы питания у бактерий разнообразны в зависимости от того, в какой мере данный микроорганизм способен синтезировать органические вещества:

для одних — *прототрофов* — питательными субстратами являются вещества в виде элементов, из которых микробы способны сами синтезировать сложные вещества;

другим — *метатрофам* — требуются для питания сложные вещества;

для *аутотрофов* нужны неорганические вещества,

для *гетеротрофов*, к которым принадлежит большинство сапрофитных бактерий, необходимы органические питательные субстраты;

патогенные бактерии — *паратрофы* — являются паразитами, для жизнедеятельности которых необходим животный белок.

К характерным особенностям процесса питания у бактерий относится,

- во-первых, исключительная быстрота и интенсивность, обусловленные пониженным осмотическим давлением, которое имеет место в клетке микробов и способствует оживленному обмену веществ с окружающей средой;

- во-вторых, большая способность бактерий приспособляться к окружающим условиям и способность изменять тип питания и химический состав своего тела; примером может служить легкость перехода от паратрофного типа питания к гетеротрофному при культивировании патогенных бактерий на мертвых органических субстратах (искусственные питательные среды) после выделения их из организма, где они питались за счет живого организма.

2.1. Основные питательные среды

Изучение разнообразных свойств микробов может производиться в лаборатории только в условиях, когда микробам обеспечена возможность расти, размножаться и проявлять свою жизнедеятельность; одним из таких важнейших условий является применение соответствующих питательных сред для выращивания микробов.

В лабораторной практике применяются жидкие и твердые (плотные) питательные среды; последние являются наиболее удобными для работы.

Основные качества питательной среды

- должны содержать все необходимые вещества (источники углерода и азота, факторы роста);

- иметь определенную pH среды: нейтральная 7,2-7,4 для большинства микроорганизмов, щелочная (холерный вибрион) – 9,0, слабокислая -6,2-6,8- туберкулезная палочка;

-прозрачными;

-стерильными;

- влажными.

- буферными- т.е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена, чтобы не изменилась pH среды;

- изотоничными – вне и внутри клетки парциальное давление должно быть одинаковым;

- определенная вязкость, консистенция;

- определенный окслительно – восстановительный потенциал- показатель насыщенности среды кислородом. Для одних м/о нужен высокий, не ниже 10, для других (анаэробы) – не выше 5;

- унифицированными – содержать постоянное количество отдельных ингредиентов – стандартный состав.

Классификация питательных сред по назначению

- универсальные – растут многие виды бактерий – МПА, МПБ, агар и бульон Хоттингера. Основой для их приготовления является мясная вода, содержащая экстрактивные вещества из свежего (не мороженого) мяса;

- дифференциально- диагностические – можно отличить один вид бактерий от других по их ферментативной активности – среды Эндо, Левина, Плоскирева, Гисса;

- селективные – на них ингибируется рост одних и стимулируется рост других микроорганизмов (используют специальные вещества: среда Плоскирева- соли желчных кислот, среда Рапопорт- желчь, селенитовый бульон- селенит). В таком случае, если даже посевной материал содержит смесь разнообразных микробов, на питательной среде раньше всего появляется рост того вида, для которого данная среда является элективной, а размножение других микробов из смеси не будет или наступит значительно позже.

- дифференциально-селективные - сочетают свойства дифференциально – диагностических и селективных сред (среда Плоскирева);

- специальные – растут бактерии, которые не растут на универсальных средах (среда Мак-Коя для туляремии, среда Левенштейна – Йенсена для микобактерий туберкулеза);

- синтетические – содержат химические вещества определенного состава (растворы неорганических солей, химические вещества как источника углерода и азота);

-полусинтетические – к синтетическим средам добавляют продукт биологического происхождения (сыворотка крови).

Приготовление мясной воды

1. 500 г мяса, освобожденного от костей, жира и сухожилий, разрезают на мелкие кусочки (или пропускают через мясорубку), заливают 1 л (двойной объем) водопроводной воды.
2. Оставляют в прохладном месте на сутки или на 2 часа в термостате при 37°.
3. Отжимают мясо через марлю или полотно.
4. Кипятят 5 минут на голом огне, отставляют, дают остыть.
5. Фильтруют через ватный фильтр и доливают водой до первоначального объема,

Приготовление мясо-пептонного бульона

1. В 1 л мясной воды растворяют при подогревании и постоянном помешивании стеклянной палочкой 10 г (1%) пептона и 5 г (0,5%) поваренной соли.
2. Устанавливают слабощелочную реакцию при помощи 10% раствора соды (или едкого натра) на лакмус (красная лакмусовая бумажка слегка синеет).
3. Кипятят 30—45 минут на голом огне.
4. Дают остыть, фильтруют через бумажный фильтр и доводят до первоначального объема (доливают водой).
5. Проверяют по компаратору (стр. 62—63) и исправляют реакцию, установив pH= 7,4—7,6 [при помощи 10% раствора щелочи, если реакция кислая, или децинормальной соляной (или уксусной) кислоты, если реакция слишком щелочная].
6. Снова кипятят, остужают, фильтруют.
7. Стерилизуют 15—20 минут в автоклаве при 120°. Перед стерилизацией приготовленный бульон разливают по 50—100 мл в колбы и по 5—6 мл в пробирки. Разливают бульон через стеклянную воронку, на конец которой надета резиновая трубка с зажимом Мора и присоединенным к ней стеклянным наконечником; при этом нельзя мочить бульоном края пробирки, чтобы к ним не пристала ватная пробка.

Обычный, или “простой”, бульон пригоден для выращивания большинства бактерий; для некоторых же из них, более требовательных к питательной среде, к бульону добавляют 1 % глюкозы (“сахарный” бульон для культивирования стрептококка), 2—5% глицерина (“глицериновый” бульон для туберкулезных бактерий), 10—20% сыворотки, 25—30%

асцитической жидкости. Обычная нейтральная или слабощелочная реакция бульона для некоторых бактерий должна быть изменена на более кислую (pH=6,8 для туберкулезной палочки) или более щелочную (pH=7,8 для дифтерийной палочки, pH=7,8—8,0 для холерного вибриона).

Приготовление мясо-пептонного агара

1. К приготовленному бульону прибавляют 2—3% агар-агара**,** предварительно измельченного, и нагревают среду в текучепаровом аппарате или на горелке до полного растворения его. Аагар-агар — растительный студень, добываемый из морских водорослей. Будучи добавлен к жидкой среде, агар-агар придает ей такую плотность, что расплавление ее возможно только при температуре кипения.
2. Расплавляют в автоклаве.
3. Остужают агар до 50°.
4. Для просветления среды добавляют белок одного куриного яйца, тщательно смешанный с двойным количеством холодной воды.
5. Помещают в автоклав на 45 минут при 115° для осаждения (хлопья свернувшегося белка адсорбируют все взвешенные частицы).
6. Фильтруют агар или через бумагу, или через слой ваты в горячем автоклаве, или в специальной металлической воронке с двойной стенкой, куда налита горячая вода; при этом воронка все время подогревается сбоку.
7. Разливают через стеклянную воронку с зажимом в посуду (пробирки, флаконы, колбы), не смачивая краев, чтобы не пристала пробка.
8. Стерилизуют в автоклаве в течение 15—20 минут При 120°.
9. Приготовляют в пробирках скошенный и прямой агар (или агар столбиком). В первом случае пробирки с расплавленным агаром оставляют в наклонном положении (рис. 33) до полного застывания; во втором случае пробирки помещаются в штатив в стоячем положении.

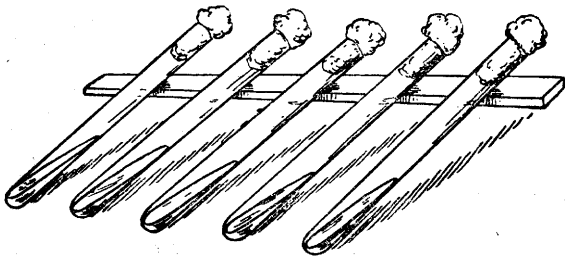


Рис. 33. Приготовление скошенного агара

Среда с агар-агаром имеет то преимущество, что она является твердой (плотной), ввиду чего важнейшие манипуляции (например, выделение чистых культур) возможны только на агаре. Поэтому мясо - пептонный агар является основной средой в лабораторной практике; он применяется в виде “простого” агара или после добавления к нему дополнительных веществ (например, углеводов) и индикаторов в виде сложных дифференциально - диагностических сред, или так называемых “элективных” сред.

Определение pH питательной среды

Рост микробов, их морфология и физиологические свойств” проявляются только на питательной среде определенной реакции, так как микробы весьма чувствительны к ней. Поэтому-чрезвычайно важно установление соответствующей реакции питательной среды. Определение реакции среды при помощи лакмусовой бумажки является самым простым, но вместе с тем и самым неточным способом. Весьма точным и удобным способом является определение в среде концентрации водородных ионов (Н) колориметрическим путем в специальных приборах — компараторах.

Водородный показатель обозначается символом pH, представляющим логарифм величины (Н), взятый с обратным знаком. Опытом установлено, что у чистейшей нейтральной дестиллированной воды pH=7; выше 7 идут показатели щелочной реакции, ниже 7—показатели кислой реакций.

Практически определение pH среды производится при помощи компаратора (например, компаратора Михаэлиса), к которому имеется набор стандартов — ряд запаянных пробирок с жидкостями, окрашенными в один и тот же цвет, но с разной интенсивностью;

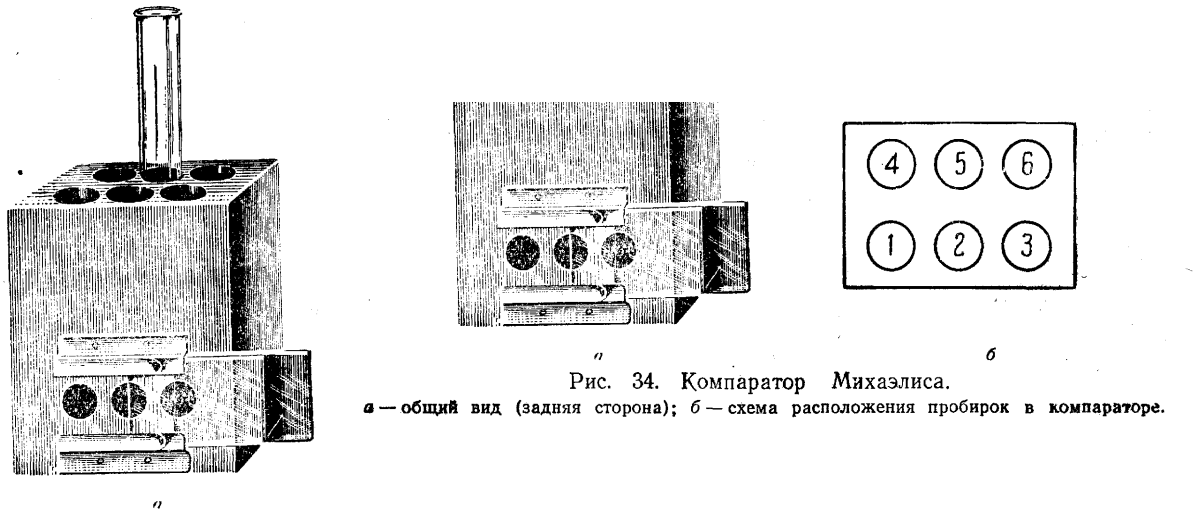


Рис. 34. Компаратор Михаэлиса.
а — общий вид (задняя сторона); *б* — схема расположения пробирок в компараторе.

интенсивность окраски является показателем соответствующей кислотности или щелочности жидкости в пробирке. Цветным индикатором в компараторе Михаэлиса является мета- и паранитрофенол. Стандарты подобраны таким образом, что разница реакции в рядом стоящих пробирках весьма невелика — 0,2; pH жидкости в пробирках подобран от 5,4 (очень кислая реакция) до 8,6 (сильно щелочная реакция). На этикетке обозначен pH в каждой пробирке.

Определение pH производится в специальном штативе (рис. 34), в отверстия которого вставляют пробирки в. следующем порядке: на второе место ставят пробирку с испытуемым раствором, например, бульоном,—2 мл бульона+4 мл дистиллированной воды+1 мл индикатора (метанитрофенол); позади испытуемой пробирки, т. е. на пятое место, ставят пробирку с дистиллированной водой. По бокам испытуемой пробирки, т. е. на первое и третье места, ставят пробирки с 2 мл бульона 4-5 мл дистиллированной воды (без индикатора). В отверстия четвертое и шестое ставят стандартные пробирки с такими показателями pH, между которыми хотят установить реакцию приготовляемого бульона, например, pH=7,2 и pH=7,6, если хотят установить реакцию pH=7,4.

Пробирку рассматривают на свет через нижние отверстия компаратора на фоне голубой пластинки. Если цвет испытуемой пробирки не совпадает со стандартом, в нее добавляют из градуированной бюретки щелочь до тех пор, пока цвет не сравняется со стандартом. Количество добавленной щелочи на 6 мл бульона пересчитывается на весь объем приготовляемого бульона. Следует иметь в виду, что после стерилизации среда становится более кислой.

2.2. Другие питательные среды

Кроме основных питательных сред — мясо-пептонного бульона и мясо-пептонного агара, имеющих самое широкое применение в практике, заслуживает внимания ряд других сред, достаточно часто употребляемых при бактериологической работе.

Кровяной агар

Агар с добавлением крови - кровяной агар - употребляется чаще всего для выявления гемотоксичных свойств микроба, например, у сгемолитического стрептококка. Он является также хорошей питательной средой для патогенных микробов, требующих при росте на искусственной среде добавления субстратов животного происхождения, например, для

пневмококка. Эта среда является также элективной для особой группы бактерий, характеризующейся гемоглобинофильными свойствами (возбудитель коклюша, возбудитель мягкого шанкра).

Способ приготовления 1. Расплавляют мясо-пептонный агар (в определенном количестве) на водяной кипящей бане и охлаждают до 50°.

2. К остуженному агару добавляют стерильно 5—10% дефибринированной крови (бараньей, кроличьей) и тщательно смешивают ее (без образования пузырьков), например, осторожно наклоняя несколько раз колбу или пробирку или .вращая ее между ладонями.

3. Разливают, не давая остыть, в чашки Петри нетолстым слоем или в пробирки по 3—4 мл для приготовления скошенного агара.

Свернутая сыворотка

Эта среда пригодна для выращивания многих микробов, но в основном она применяется при микробиологическом диагнозе дифтерии, так как является элективной для дифтерийной палочки. Среда .готовится из стерильной лошадиной или бычьей сыворотки. Будучи налита в пробирки, сыворотка свертывается при 80°.

Для свертывания берут или обычную неразведенную сыворотку (среда Ру), или сыворотку, разведенную сахарным бульоном (3 части сыворотки + 1 часть бульона) - среда Леффлера. Свертывание производится в специальном аппарате Коха с двойными стенками, куда наливается вода, медленно нагреваемая до 80° (аппарат снабжен термометром, погруженным в воду между стенками).

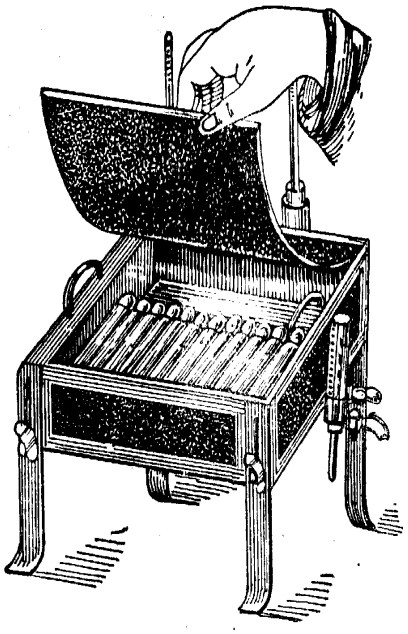


Рис. 35. Аппарат для свертывания сыворотки.

Стерильные пробирки, в которые налито по 3—4 мл сыворотки, помещают в наклонном положении в аппарат Коха (рис. 35), где она подвергается свертыванию при температуре 80° в течение 1—1/2 часов 3 дня подряд. Свернутую сыворотку ставят на сутки в термостат для проверки ее стерильности.

Мясо-пептонная желатина

К мясо - пептонному бульону прибавляют 10—15% мелко нарезанной желатины, дают ей набухнуть и нагревают в кастрюле на голом огне до полного растворения. Она должна иметь pH 7,1—7,2. Затем охлаждают до 60°, прибавляют яичный белок, из расчета 1 белок на литр желатины, и кипятят в текучепаровом аппарате Коха (при 100°) в течение часа. После варки проверяют реакцию, фильтруют (в горячем виде), разливают по пробиркам, колбам, флаконам и подвергают дробной стерилизации в аппарате Коха 3 дня подряд по 1 часу. После стерилизации ставят среду для контроля стерильности в термостат на трое суток.

2.3. Диференциально - диагностические среды для бактерий кишечно-тифозной группы

Среда Эндо

К стерильному расплавленному 3% агару добавляют (на 1 л питательной среды): 1) 10 г лактозы; 2) 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, нейтрализованного10% водным раствором сульфита натрия (индикатор Андреде). Свежеприготовленная среда бесцветна или имеет бледно-розовую окраску. pH среды нейтральная. Среду готовят и разливают в стерильные чашки Петри в день посева. Чашки со средой следует защищать от света, иначе **она** покраснеет.

Если микроорганизм ферментирует лактозу (lac +), выделяются кислые продукты реакции, pH сдвигается в кислую сторону, щелочь нейтрализуется, фуксин восстанавливается, цвет колоний – красный, с металлическим блеском (цвет фуксина). Если же микроорганизм не ферментирует лактозу (lac -), pH среды остается нейтральным, колонии бесцветные или слабо- розовые (цвет неизмененной среды).

Среда Левина

К 100 мл стерильного расплавленного агара добавляют: 1) 2 лактозы; 2) 1,5 мл подогретого раствора метиленовой синьки; 3) 1,5 мл раствора эозина; 4) 0,2 г двуосновного фосфорнокислого калия (K_2HP0_4), предварительно растворенного в стерильной воде. pH среды нейтральный, цвет среды темно-фиолетовый. Среду разливают по чашкам. Лактозоотрицательные бактерии образуют бесцветные колонии, лактозоположительные - черные, протей – оранжевые.

Среда Плоскирева

Содежит мясо-пептонный агар, лактозу, бриллиантовый зеленый, соли желчных кислот, минеральные соли, индикатор нейтральный красный. Среда является и дифференциально-диагностической и селективной, т.к. соли желчных кислот и бриллиантовый зеленый ингибируют рост кишечной палочки (бактериостатическое действие) и соли желчи стимулируют рост сальмонелл и шигелл. Лактозоферментирующие бактерии образуют красные колонии (метиловый красный восстанавливается из-за сдвига pH в кислую сторону), лактозоотрицательные бактерии образуют бесцветные колонии.

Среды с углеводами для “пестрого ряда”

а) Сбраживание углеводов

В зависимости от вида микроорганизмов сбраживание углеводов происходит с образованием различных веществ (маслянокислое, уксуснокислое, спиртовое и другие виды брожения). Способность разлагать различные углеводы (как принято называть “сахара”) с образованием альдегидов, кислот и газообразных продуктов (CO2, H2, CH4) обнаруживается при посеве на жидкие среды Гисса с различными углеводами (лактоза, глюкоза и др.) и реактивом Андреде (стр. 66) или лакмусовой настойкой в качестве индикатора.

Принцип конструирования сред пестрого ряда Гисса:

1. жидкая или полужидкая (для улавливания газообразования) питательная основа;
2. субстрат (1% раствор углевода или многоатомного спирта, аминокислоты)- глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, манит)
3. индикатор pH. В жидких средах используют индикатор Андреде. Готовая среда имеет pH 7,2-7,4, цвет бледно-розовый, при образовании кислоты, среда краснеет. Для улавливания газообразования используют стеклянный поплавок. В полужидких средах используют индикатор ВР (водный голубой и розоловая кислота), готовая среда бесцветная. При образовании кислоты среда синеет, щелочи – краснеет. Образующийся газ разрывает столбик полужидкого агара.

Среды разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 1 часу.

4. включают пробирку с мясо - пептонным бульоном (МПБ) для изучения культуральных и протеолитических свойств.

Некоторые микроорганизмы имеют **особенности роста на жидких средах**:

- палочка чумы - образует тонкую пленку. Пленка со временем грубеет, от нее вниз ко дну пробирки спускаются «сталактиты», образуется рыхлый осадок, бульон остается прозрачным;
- бацилла сибирской язвы – на дне пробирки образуется пушистый осадок «комочек ваты», бульон остается прозрачным;
- холерный вибрион – через 6 часов на 1% пептонной воде образуется нежная голубовато-серая пленка, спаянная со стенками пробирки. Хорошо видно при наклоне пробирки;
- стрептококки – образуют придонно- пристеночный рост, осадок, бульон остается прозрачным.

5. пробирка со средой Пешкова - для определения подвижности.
6. пробирка со скошенным МПА - для накопления и сохранения чистой культуры.

б) Расщепление белков

Расщепление белков (гниение), являющееся одной из стадий круговорота азота в природе, осуществляется различными микроорганизмами.

Разложение микробами белка сопровождается образованием индола и выделением сероводорода. Для обнаружения этих реакций делают посев на бульон или пептонную воду и выдерживают засеянную среду в термостате в течение 2—3 дней.

Разжижение желатины

У некоторых бактерий (холерный вибрион, стафилококк, сибиреязвенная палочка и т. д.) протеолитический фермент выявляется путем разжижения желатины, свернутой сыворотки и других белковых сред. Проводят посев культуры уколом в столбик желатина. Инкубируют при 22°С несколько дней. Происходит разжижение желатина, образуется воронка или «елочка». Процесс разжижения идет сверху, причем различные виды микробов дают характерную для них форму разжижения (рис. 48): в форме гвоздя холерный вибрион, б), в форме чулка (стафилококк, *в)* или послойное, т. е. идущее ровно сверху вниз (синегнойная палочка, *д*).

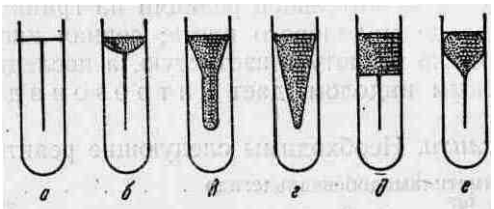


Рис. 48. Разжижение желатины при посеве уколом (схема).
а — линия укола при посеве; *б* — разжижение желатины в форме гвоздя; *в* — в форме чулка; *г* — воронкой; *д* — послойное; *е* — реповидное.

Посев на МПБ для улавливания продуктов расщепления аминокислот: аммиака, индола, сероводорода. Полоски фильтровальной бумаги, пропитанные реактивами, помещают под пробку пробирки так, чтобы бумага не касалась жидкости.

Обнаружение аммиака

1. Для улавливания аммиака используют розовую лакмусовую бумагу - синеет.

Реакция на индол

1. *Способ Эрлиха.* Необходимы следующие реактивы:
Парадиметиламидобензальдегида ..... 4 г
Спирта 96° ..... 380 мл

Соляной кислоты концентрированной . . 80 мл.
К бульонной культуре (например, кишечной палочки) прибавляют 1—2 мл эфира. Пробирку сильно встряхивают несколько раз, затем добавляют по стенке пробирки 1—2 мл раствора. При наличии индола не позднее чем через 5 минут появляется красное окрашивание всего эфирного слоя.
2. Для улавливания индола используют реактив (щавелевая кислота). После 1—3дневной инкубации в термостате в случае образования индола нижняя часть бумажки окрашивается в розовый цвет.

Реакция на сероводород

Для реакции на сероводород используют уксуснокислый свинец. При выделении сероводорода образуется сернокислый свинец (PbS) – бумага чернеет.

в) Редукция красящих веществ

Редуцирующая (восстанавливающая) способность микробов определяется их отношением к определенным органическим краскам, которые они переводят в бесцветные лейкопродукты. Последние при обильном доступе кислорода снова дают основной цвет краски. К таким краскам принадлежит метиленовая синька, тионин, лакмус, индигокармин, нейтральная красная и др.

Редуцирующую способность микроорганизмов исследуют, прибавляя растворы указанных красок к жидким или твердым питательным средам, на которые производят посевы исследуемых микробов; чаще всего для этой цели пользуются посевом уколом в агар столбиком. Такие посевы позволяют наблюдать постепенное обесцвечивание (редукцию) краски по ходу укола. Исследованием редуцирующей способности микроба пользуются для дифференциально -диагностических целей.

Редуцирующая способность резко выражена у ряда бактерий кишечной группы: E. coli, Salmonella paratyphi B, S. paratyphi A. Для обнаружения ее делают посев уколом на среду Ротбергера [агар + 1 % глюкозы + несколько капель насыщенного раствора нейтральной красной краски (нейтральрот)]. Через 2—3 суток среда меняет свой цвет: красный цвет агара, особенно в нижней части пробирки, переходит в желтый, желто-зеленый, слегка флюоресцирующий. Одновременно энергично проявляется и разложение углевода — глюкозы; образующаяся при этом углекислота разрывает столбик агара, поднимая кусочки его вверх по пробирке.

Сухие питательные среды

В настоящее время широко пользуются сухими питательными средами В виде порошков или таблеток, содержащих как основные питательные, так и добавочные вещества (сухие МПБ и МПА, различные дифференциально-диагностические среды и др.1 Порошок растворяют в определенном объеме дистиллированной воды, среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют (кроме дифференциально-диагностических сред). Постоянство состава, простота и удобство работы, легкость транспортировки и хранения являются чрезвычайно ценными качествами сухих сред, особенно при пользовании ими в походных лабораториях.

Синтетические среды

Эти среды готовят из неорганических и органических соединений, способных обеспечить азотистое, углеродное и минеральное питание микроорганизмов. Состав этих сред всегда точно известен и всегда постоянен, что представляет большое удобство для работы. Эти среды ценны в том отношении, что по их составу можно определить потребность изучаемого вида микробов в тех или иных питательных веществах.

3. Культивирование микроорганизмов

3.1.Термостат

Для роста и размножения микроорганизмов, кроме питательной среды, необходимы и соответствующие температурные условия. Для различных видов микроорганизмов температура, которая является наиболее благоприятной (оптимум) для их размножения, и температурные пределы (низший — минимум и высший — максимум) неодинаковы.

Температура культивирования микроорганизмов:

- для термофилов (thermos — теплый, filein — любить) оптимум составляет 50—60°, минимум 35°, максимум 70—75°;
- для психрофилов (psichros— холодный) оптимум составляет 15—20°, минимум 0°, максимум 30—35°;
- для мезофилов (mesos — средний) оптимум составляет 30—37°, минимум 10°, максимум 40—45°.

Все патогенные микробы относятся к мезофилам, и для подавляющего большинства из них оптимумом является температура человеческого тела — 37°.

Для выращивания микробов пользуются термостатами (рис. 40) (специальные шкафы), в которых поддерживается постоянная температура при помощи особых приборов, называемых терморегуляторами. Терморегуляторы бывают разных типов, но их устройство таково, что как только температура достигнет установленного уровня, автоматически уменьшается или прекращается доступ притока тепла. Существенной частью терморегулятора обычно является какое-либо тело (металл, газ, эфир, ртуть), легко изменяющее свой объем под влиянием тепла: расширение объема тела при перегреве автоматически уменьшает приток тепла к термостату, так как происходит выключение тока (или другого источника тепла) и прекращение нагрева; при понижении температуры объем тела уменьшается и приток тепла возобновляется.

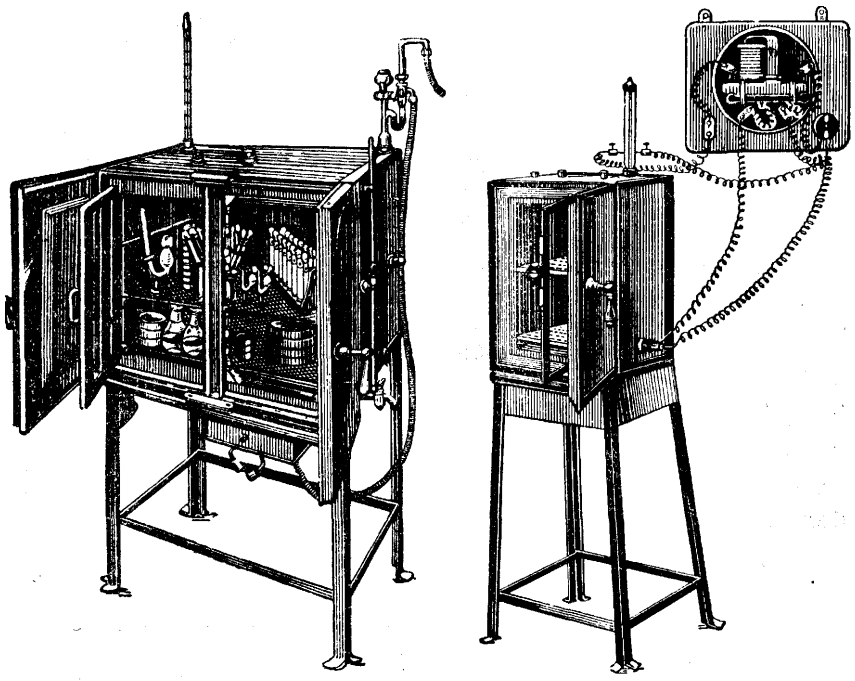


Рис. 40. Термостаты.

Термостаты имеют двойные стенки (наружная стенка сделана из плохого проводника тепла — линолеума, дерева), между которыми находится воздух или вода, подогреваемая каким-либо источником тепла — электричество, газ, керосиновая лампа. Дверца термостата

плотно закрывается.

Крышка термостата обычно снабжена термометром и вентиляционными отверстиями. Стенки термостата должны быть непроницаемы для света, вредно действующего на микробов.

Культуры бактерий чаще всего помещают в термостат на 24 часа — срок, обеспечивающий максимальное размножение большинства патогенных бактерий.

4. Бактериологический метод диагностики. Выделение чистой культуры и её идентификация

4.1. Этапы выделения чистой культуры и ее идентификация

I этап. Рассев смеси бактерий (исследуемый материал) на плотные питательные среды с целью получения изолированных колоний. В зависимости от клиники (кишечная, капельная инфекции и т.д.) следует сеять на те среды, на которых микроорганизм будет активно размножаться. Также проводится посев на жидкие среды накопления, т.к. в исследуемом материале может быть мало возбудителя.
II этап. Отбор подозрительных по внешнему виду колоний, микроскопия части колонии, и пересев оставшейся части на подходящую свежую питательную среду для накопления и сохранения чистой культуры. Инкубация в течении 18 часов при 37°.
III этап. Идентификация чистой культуры по биохимическим, антигенным, патогенным, токсигенным свойствам. Инкубация в течении 18 часов при 37°. Определение резистограмм.
IV этап. Анализ полученных результатов и выдача заключения.

4.2. Идентификация возбудителя по дням исследования

1 день. Посев материала на подходящие плотные и жидкие питательные среды. Инкубация в течение 18 часов при 37°.
2 день. Изучение выросших колоний (размер, характер поверхности, цвет, характер краев, консистенция). Микроскопия части колонии по Грамму и отсев оставшейся части колонии на скошенный МПА. Инкубация в течениу 18 часов при 37°.
3 день. Идентификация выделенной чистой культуры: постановка «пестрого ряда» Гисса с целью изучения биохимических (сахаролитических и протеолитических) свойств, посев на жидкие среды для изучение культуральных свойств, изучение антигенной структуры в реакции агглютинации на стекле с диагностическими антисыворотками, определение чувствительности к антибиотикам и бактериофагу. Определение наличия ферментов патогенности и наличия токсигенности. Инкубация в течении 18 часов при 37°.
4 день. Анализ полученных результатов и выдача заключения.
5 день. Так как на 2-ой день пересевают материал со среды накопления на плотную питательную среду и далее исследование проводят по схеме, то на 5 день повторно проводят анализ результатов.

4.3. Бактериологический метод диагностики.

Недостатки: длительность, громоздкость.
Преимущества: определение вида микроорганизма, чувствительности к антибиотикам, химиопрепаратам и бактериофагам для лечения, значение для эпидемиологов (вспышка одного очага или это разные очаги с различными результатами фаготипирования, для определения источника инфекции)

Первый день: ***посев исследуемого материала.***

Посевы на жидкие среды

Техника посева на жидкие питательные среды (бульон) в основном такова, как и посева на твердые среды. Как отличительные особенности посева на жидкие среды нужно учесть следующее.

1. Не допускать, чтобы жидкость питательной среды выливалась при горизонтальном положении пробирки.

2. Следить, чтобы жидкость не смачивала краев пробирок и ватных пробок.

3. При пересеве с жидкой среды на жидкую можно пользоваться петлей, стерильной градуированной пипеткой или стерильной пастеровской пипеткой. Капилляр пастеровской пипетки отламывают прокаленным пинцетом, слегка обжигают на пламени горелки, после чего пипетку вносят в посевной материал; последний набирают в капилляр пипетки путем насасывания (следить, чтобы в открытом конце пипетки находилась вата!), после чего верхнее отверстие пипетки быстро и плотно зажимают указательным пальцем правой руки. Затем пипетку погружают в свежую питательную среду, куда и выдувается ее содержимое; после посева пипетки немедленно помещают в дезинфицирующий раствор.

Посев уколом

Посев уколом в агар столбиком (прямой агар) применяется или для выращивания анаэробов, или для выявления характерного признака микроба, так как рост по уколу типичен для целого ряда бактерий: например, у сибиреязвенной палочки характерный рост по уколу имеет вид опрокинутой елочки; при посеве уколом в столбик желатины наблюдается разжижение ее у бактерий, обладающих протеолитическим ферментом, и т. д. Посев уколом практикуется также с целью длительного хранения культур.

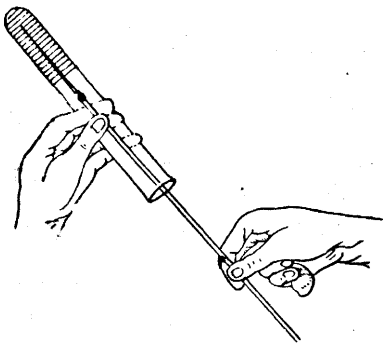


Рис. 41. Посев уколом.

При посеве уколом пробирку с прямым агаром (или столбиком желатины) держат дном кверху (рис. 41), вынимают пробку и обжигают край пробирки; материал, содержащий микробы, забирают простерилизованной на пламени платиновой иглой и прокалывают ею столбик питательной среды снизу вверх, почти до самого дна пробирки. Осторожно вынимают иглу, обжигают край пробирки и пробку, закрывают пробирку, тщательно прожигают иглу, ставят ее в штатив, надписывают пробирку и ставят в коробку.

Методы выделения чистых культур

Выделение отдельных видов бактерий и получение чистой культуры являются основой бактериологической работы, так как на практике чаще всего приходится иметь дело с материалом, содержащим смесь микробов. Установление же вида микроба и изучение всех его свойств возможны только тогда, когда бактерии получены в чистом, изолированном виде, т. е. в чистой культуре.

Основной задачей при исследовании материала, содержащего смесь микробов, является получение отдельных колоний всех микробов, находящихся в исследуемом материале. Простейший способ — механическое разобщение микробов на поверхности плотной питательной среды на чашке Петри (рис. 42) среднего размера, 10 см в диаметре.

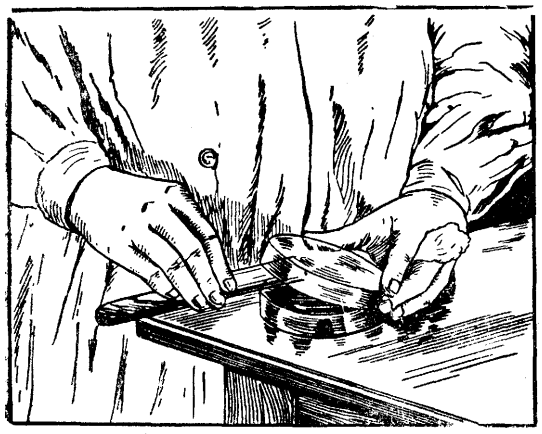


Рис. 42 Разливка агара в чашки.

Выделение чистых культур методом рассева на чашках

Посев шпателем

Простейшим способом разъединения

микробов является последовательное растирание исследуемого материала стеклянным шпателем (рис. 43) или петлей по поверхности агара на нескольких чашках Петри с питательной средой.

Агар в чашках приготовляют заранее следующим образом (рис. 42): стерильный агар, находящийся в колбах или флаконах, расплавляют на водяной бане; колбу с расплавленным агаром берут в правую руку, левой рукой вынимают пробку; обжигают горлышко колбы и большим и указательным пальцем левой руки приподнимают крышку чашки лишь настолько, чтобы в щель могло пройти горлышко колбы со средой. Вводят горлышко под крышку чашки (не касаясь ее краев), наливают в чашку 10—15 мл питательной среды, быстро выводят горлышко колбы из чашки и закрывают крышку последней. Тотчас же обжигают край горлышка колбы и пробку и закрывают колбу. Если среда не распределилась равномерно по дну чашки, то, осторожно покачивая чашку, среду распределяют ровным слоем толщиной приблизительно в 0,5 см.

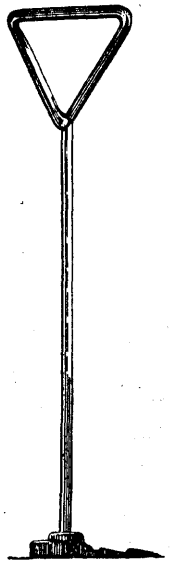


Рис. 43. Стеклянный шпатель.

Пока среда не застынет, чашки нельзя передвигать или переносить. Застывшую среду подсушивают в термостате или в закрытых чашках в течение 1—2 часов или в открытых чашках в течение 30 минут. В последнем случае открытые чашки помещают дном вверх на полках термостата, покрытых стерильной бумагой. При подсушивании испаряется конденсационная вода с поверхности питательной среды и с внутренней поверхности чашки. Первый день: *посев исследуемого материала.* Посев производится на трех занумерованных чашках Петри (I, II, III) с питательной средой. Для посева заранее заготовляются стеклянные шпатели, завернутые в бумагу и простерилизованные. Можно стерилизовать шпатель обжиганием **на** пламени горелки тотчас после погружения шпателя в спирт.

1. На поверхность питательной среды в чайке I наносят петлей или стерильной пастеровской пипеткой каплю исследуемого материала и растирают ее стерильным шпателем, двигая его сначала взад и вперед на небольшом участке, а затем круговыми движениями по всей поверхности питательной среды.

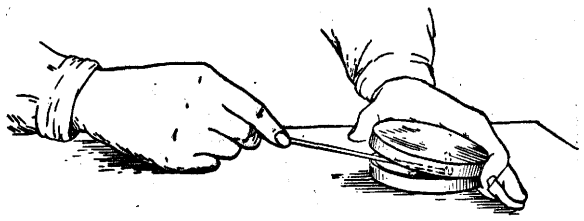


Рис. 44. Посев шпателем на чашки.

При этом крышку чашки приоткрывают левой рукой лишь настолько, чтобы в щель мог пройти только шпатель (рис. 44).

2. Вынимают шпатель из чашки I, закрывают ее и быстро переносят шпатель в чашку II, не прожигая его. Растирают материал по всей поверхности среды, прикасаясь к ней той же стороной шпателя, которой растирался материал в чашке I. Чашку II закрывают.

3. Так же переносят шпатель в чашку III и растирают материал по поверхности питательной среды той же стороной шпателя. Закрывают чашку. Шпатель прожигают или опускают в дезинфицирующую жидкость.

4. Чашки надписывают (название материала, фамилия больного, дата) и ставят в термостат вверх дном, чтобы образующиеся капельки паров воды, попадающие на крышку, не стекали на поверхность среды и не размывали посева. Чашки находятся в термостате 18—24 часа.

Посев петлей

Вышеописанное выделение чистых культур из смеси микробов путем механического разобщения последних на поверхности плотной питательной среды можно произвести, пользуясь обыкновенной петлей для посева, а не шпателем. В этом случае посев производят следующим образом.

1. Простерилизованной на пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и осторожно вводят петлю в чашку.
2. На поверхности питательной среды чашки распределяют материал петлей параллельными штрихами на расстоянии 0,5 см один от другого от одного края чашки к другому, держа петлю плашмя (не царапать питательной среды!).
3. Вынимают петлю из чашки; тотчас же, закрыв чашку, обжигают петлю и ставят ее в штатив.
4. Чашку надписывают и помещают в термостат дном вверх на сутки.

Рост на чашке на первом штрихе сплошной, на следующих — изолированными колониями.

Все дальнейшие манипуляции с изолированными колониями совершенно такие же, как при посеве шпателем.

При достаточном навыке посев петлей исследуемого материала (взятого в небольшом количестве) производят всего лишь на одну чашку с агаром, получая в последних штрихах рост микробов в виде изолированных колоний. Этот способ неравноценен вышеописанному, но допустим при большой загруженности работой в целях экономии времени и питательных сред.

Второй день: ***изучение колоний и выделение чистых культур.***

Колония бактерий - это популяция микробных клеток одного вида, сформировавшееся в результате деления одной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде при оптимальной температуре.

Через сутки засеянные чашки вынимают из термостата и изучают полученные посевы. На чашке I, где было много материала, получился сплошной рост бактерий, и отдельных колоний не видно; на чашке II и в особенности на чашке III колонии распределились изолированно и поэтому легкодоступны исследованию.

Прежде всего изучают колонии макроскопические невооруженным глазом. Просматривают чашку (не открывая) со стороны дна в проходящем свете, держа ее на уровне глаз на расстоянии 20—30 см.

1. Изучают ***характеристику (морфологию) колонии:***

- размеры (крупные – 4-5 мм в диаметре, средние – 1-2 мм, карликовые- менее 1мм);
- форма (круглая, плоская, сферическая);
- прозрачность (мутные, полупрозрачные, прозрачные);
- цвет (бесцветная, выделение пигмента);
- характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая, складчатая);
- расположение колонии на поверхности среды - профиль (выпуклое, плоское, вдавленное, врастающее в агар);
- характер краев колонии (ровные, фестончатые, зазубренные);
- структура колонии (гомогенная, зернистая, однородная или различная в центре и по периферии);
- консистенция (маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая).

Обнаруживают, что посев смеси микробов дал рост неоднородных колоний. Если для посева была взята смесь из культур лимонно-желтого стафилококка и кишечной палочки, то вырастают два вида колоний: более прозрачные крупные голубоватые колонии (кишечная палочка) и мелкие плотные колонии желтоватого цвета (стафилококк).

1. Каждому виду микробов на определенной питательной среде присуща типичная форма колонии. Изучают невооруженным глазом или с помощью лупы.

2. Еще лучше видна разница в структуре колоний при рассмотрении их с увеличением. Для этого пользуются или лупой, или вынутым из тубуса микроскопа окуляром, или микроскопом со слабой сухой системой при суженной диафрагме или несколько опущенном конденсоре. При изучении под микроскопом чашку помещают на столике дном вверх и, передвигая ее, отмечают на чашке карандашом колонии различной формы, очерчивая их кружком.

Под микроскопом резко выявляется строение колоний: характер краев (ровные, фестончатые, зазубренные), характер поверхности (гладкая, шероховатая), структура (гомогенная, зернистая, однородная или различающаяся в центре и по периферии).

Каждому виду микробов свойствен определенный характер колоний. Нередко характер колоний имеет диагностическое значение для определения возбудителя болезни.

3. Из части каждой из намеченных колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и убеждаются, что голубоватые колонии содержат грамотрицптельные кишечные палочки, а желтоватые — грамположительных стафилококков. Таким образом, из смеси могут быть выделены отдельные виды чистых культур бактерий.

Намеченные колонии пересеиваются на пробирки с косым агаром, причем нужно тщательно следить, чтобы взять именно намеченные колонии, не задевая петлей близлежащих колоний. Из остатка колонии, находящегося на петле после посева, следует приготовить мазок и окрасить его, чтобы микроскопией, проверить чистоту изучаемой колонии и морфологию микробов в ней.

Пробирки с посевами помещают в термостат на 18—24 часа.

2. Производят подсчет колоний.

Третий день: ***проверка чистоты культуры и изучение свойств микроба.***

Изучение биохимических свойств бактерий для дифференциально-диагностических целей

Через сутки пробирки с посевами вынимают из термостата и убеждаются, что в каждой из них получен посев однородной культуры, отличающейся от культуры в другой пробирке. В пробирке с посевом кишечной палочки культура имеет вид обильного сочного налета беловатого цвета; культура стафилококка более сухая, слегка желтоватая. Проверяется чистота культуры и изучается морфология бактерий в мазках, окрашенных по Граму.

Полученная чистая культура может быть использована для любых целей. При выделении чистой культуры из патологического материала (мокрота, гной, кровь, испражнения больного) с целью установления микробиологического диагноза необходимо точное распознавание возбудителя заболевания:

- микроскопическим путем, или
- путем посевов на дифференциально-диагностические среды для изучения биохимических свойств микроба, или
- путем определения природы выделенной бактерий с помощью специфических серологических реакций (реакции с иммунными сыворотками, содержащими антитела).

Химическая активность микробов, как указывалось, чрезвычайно разнообразна; она обусловлена богатством у микробов различных строго специфических ферментативных систем и условиями среды.

В медицинской микробиологии изучение биохимических свойств микробов является одним из основных дифференциально - диагностических методов для точного распознавания возбудителя болезни. Особое значение этот метод приобрел в диагностике кишечных заболеваний (брюшной тиф, паратифы, дизентерия, пищевые отравления). Подробный

анализ этого метода излагается при диагнозе соответствующих инфекций.

Для биохимической дифференциации микробов в основном изучаются следующие их свойства:

1) способность сбраживать углеводы с образованием кислоты или кислоты с газом;

2) способность разлагать белковые продукты;

3) способность редуцировать краски.

Для обнаружения этих свойств микробов пользуются посевом их на дифференциально - диагностические питательные среды (жидкие и плотные), содержащие вещества, в отношении которых микробы способны проявлять свою химическую (ферментативную) активность. Результат реакции определяется при помощи добавляемых в питательную среду различных индикаторов, дающих в большинстве случаев цветные реакции. Поэтому метод посева на дифференциально - диагностические среды получил название посева на “пестрый ряд”.

Рассмотрим пример, демонстрирующий биохимическую активность микробов при посеве на пестрый ряд. Наилучшим объектом для этой цели может служить кишечная палочка (Esherichia. coli), как обладающая чрезвычайно энергичными ферментативными способностями. Противоположным примером является брюшнотифозная палочка (Salmonella. typhi) — микроб, родственный кишечной палочке, но значительно утративший свою химическую активность в связи с паразитическим образом жизни.

Процесс кислотообразования обнаруживается также при посеве на м о л о к о: молоко, засеянное кишечной палочкой, через сутки створаживается, так как кишечная палочка разлагает молочный сахар с образованием молочной кислоты; молоко, засеянное брюшнотифозной палочкой, остается неизмененным.

Светящиеся бактерии

Существует довольно много видов светящихся бактерий (кокки, палочки, вибрионы), у которых окислительные процессы в клетке сопровождаются отдачей световой энергии; свечение моря, гнилого дерева, пищевых продуктов (мясо, рыба) обусловливается присутствием светящихся бактерий, или фотобактерий.

Для получения культур светящихся бактерий можно воспользоваться следующим приемом: кусок мяса или рыбы погружают наполовину в 3% раствор поваренной соли и оставляют под колоколом в прохладном (5—10°С) темном месте. Через сутки появляется свечение.

Дальнейшее содержание культур светящихся бактерий в лаборатории производят на рыбных питательных средах (бульон, агар).

4.4. Пигменты микробов

Некоторые виды микроорганизмов (бактерии, грибы) в процессе обмена образуют особые красящие вещества—пигменты разнообразных цветов.

Пигмент образуется или только внутри клеток, или **же** он выделяется из них, окрашивая, например, питательную среду.

По различному отношению к растворителям — воде, спирту, эфиру и др - различают:

1. Пигменты, растворимые в воде и окрашивающие питательную среду (например, синий пигмент пиоцианин, выделяемый синегнойной палочкой—Pseudomonas aeruginosa).

2. Пигменты, нерастворимые в воде и растворимые в спирту (например, продигиозин — красный пигмент Bact. prodigiosum).

3. Пигменты, нерастворимые ни в воде, ни в спирту, встречаются редко.

Пигменты образуются обычно только в присутствии кислорода и часто только в определенных условиях (определенный состав питательной среды, температура и т. д.).

Контрольные вопросы к занятию № 4 «Питание микроорганизмов. Питательные среды. Идентификация микроорганизмов»

1. Методы посева на плотные питательные среды
2. Питание микроорганизмов.
3. Питательные среды: основные качества, классификация по назначению.
4. Приготовление мясной воды, мясопептонного бульона, мясопептонного агара.
5. Универсальные среды: состав сред МПБ, МПА, КА, свернутой сыворотки.
6. Дифференциально - диагностические среды: Эндо, Левина.
7. Селективные среды: Плоскирева.
8. Среды «пестрого ряда». Принцип конструирования, учет результатов.
9. Особенности роста м/о на жидких средах.
10. Изучение сахаролитических свойств бактерий.
11. Изучение протеолитических свойств бактерий
12. Температура культивирование микроорганизмов. Термостат.
13. Этапы выделения чистой культуры.
14. Идентификация возбудителя по дням исследования
15. Первый день: посев исследуемого материала.
16. Второй день: изучение колоний и выделение чистых культур.
17. Колония микроорганизмов, её характеристика.
18. Третий день: Изучение свойств бактерий.
19. Пигменты бактерий.

5. Дыхание микроорганизмов

По способу дыхания микроорганизмы разделяются на аэробов и анаэробов. Аэробы используют для дыхания свободный кислород по типу дыхания высших животных, в организме которых органическое вещество расщепляется до углекислоты и воды с помощью кислорода вдыхаемого воздуха. В результате этого процесса, характеризующегося окислительными реакциями, освобождается значительное количество энергии, которая утилизируется организмом. Анаэробные микроорганизмы не только не нуждаются для своей жизнедеятельности в кислороде воздуха, но последний является для них даже губительным. Необходимую энергию анаэробы получают не путем окислительных процессов, а расщеплением содержащих большой запас скрытой энергии веществ в отсутствие свободного кислорода главным образом углеводов в процессах брожения.

Некоторые микроорганизмы, приспособляясь к окружающим условиям, способны менять аэробный тип дыхания на анаэробный и обратно,— они характеризуются как факультативные т. е. условные, анаэробы. Другие микроорганизмы способны жить только в отсутствие свободного кислорода,— они называются **облигатными**, т. е. обязательными анаэробами.

5.1. Методы культивирования анаэробов

Для культивирования анаэробов необходимо создать сниженное парциальное содержание кислорода в среде или в воздухе, с которым она соприкасается, что достигается различными методами.

Механический метод.

1. Питательные среды перед посевом анаэробов “регенерируются” — кипятятся на

водяной бане 10-20 мин. Вытесняется кислород воздуха. Быстро охлаждают среду, чтобы не дать ей насытится воздухом и производят посев. После посева их заливают сверху слоем парафинового или вазелинового масла для разобщения от атмосферного воздуха.

2. Для уменьшения диффузии O_2 из воздуха, питательные среды сверху заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином на 1-1,5 см. посев материала проводят через масло;

3. Добавление редуцирующих веществ – цистина, глюкозы, аскорбиновой кислоты. Редуцирующие вещества поглощают кислород. Чаще всего употребляется среда Кита - Тароцци — бульон с 0,5% глюкозы и кусочками свежих органов животных (или с мясным фаршем); кусочки органов, а также глюкоза обладают редуцирующей способностью. Среду заливают сверху слоем масла.

4. Добавление кусочков паренхиматозных органов для связывания кислорода (среда Кита – Тароцци с кусочками говяжей печени);

5. В жидкие среды добавляют пористые вещества – вата, пемза, которые на своей поверхности адсорбируют пузырьки воздуха.

Физический метод.

1. Посев по Веньяль – Вейону. Двукратные разведения исследуемой культуры в 0,5% сахарном агаре, охлажденным до 40-45 °С, набирают в пастеровскую пипетку длиной 30 см. Вытянутый конец трубки запаивают. Через 2-3 суток инкубации в столбике агара появляются колонии м/о. Если посев был не слишком густой (рекомендуют делать несколько разведении), то в среде вырастают ясно видимые снаружи колонии бактерий, которые можно извлечь, распилив трубку

2. Удаление воздуха. Для этого пользуются особым прибором: вакуум – анаэростатом, из которого воздух выкачивается насосом. Используя специальные газовые пакеты, проводят замену атмосферного воздуха газовой смесью;

3. Эксикатор со свечой. Крышку эксикатора хорошо притирают и пока горит свеча, кислород сгорает, заменяясь углекислым газом.

Химический метод.

1. Производят посев на плотную среду на чашке Петри. На крышку чашку помещают химический поглотитель: гипосульфит Na, щелочной пирагаллол;

Биологический метод.

1. Метод Фортнера. Совместное культивирование строгих анаэробов и аэробов на кровяном агаре с глюкозой, разделенного пополам вырезанной по середине чашки прокаленным стерильным скальпелем небольшой полоской агара. На одной половине агара делают посев культуры аэроба, на другой — посев анаэробной культуры. Чашку Петри парафинируют. Сначала растут аэробы (быстро), после снижения содержания O_2 – анаэробы (медленно, к 7 дню). В качестве строгих аэробов используют Bacterium prodigiosum (чудесная палочка), Serracia marcensens.

5.2. Выделение чистых культур анаэробов

Первый день.

1. Накопление материала. Исследуемый материал (например, земля, гной) засевают

пастеровской пипеткой на среду Китта - Тароцци, прокипяченную в течение 20 минут перед посевом и остуженную (регенерация среды). После посева материала среду нагревают 15 минут при 80° для уничтожения вегетативной флоры; споры анаэробов, при этом не уничтожаются. Пробирки с посевом ставят в термостат. Из исследуемого материала готовят мазок по Граму.

Второй день.

Через сутки среда оказывается помутневшей (рост микробов), иногда в ней видны пузырьки газа. Делают мазки, окрашивают их по Граму и обнаруживают крупные споровые и неспоровые грамположительные бациллы. Микроскопическая картина дает только ориентировочное представление о микробной флоре исследуемого материала.

2. Выделение чистой культуры может быть произведено по одному из следующих методов.

а) По Цейсслеру: каплю материала со среды Китта - Тароцци помещают на середину чашки I с кровяным сахарным агаром и распределяют по ней стеклянным шпателем; этим же шпателем производится посев в чашке II и чашке III. Посевы на чашках помещаются в термостат в анаэробных условиях. На следующий день по форме колоний (при рассматривании через лупу) и микроскопии мазков из них производится ориентировочное определение вида микроба и пересев отдельных намеченных колоний на среду Китта - Тароцци для выделения чистой культуры **и** точного определения вида микроорганизма.

б) По Вейнбергу: несколько капель из посева на среде Кита -Тароцци переносят в пробирку с бульоном, откуда затем запаянным концом капилляра пастеровской пипетки переносят их последовательно в несколько узких пробирок (или трубок Виньяля) с растопленным, прокипяченным в течение 20 минут и слегка остуженным сахарным агаром. Засеянные пробирки (или трубки) быстро охлаждают холодной водой до застывания и помещают в термостат. На следующий день изучается форма выросших колоний и отмечаются колонии для пересева, затем производится распил трубки или пробирки у места отмеченной колонии. Колонию высасывают пастеровской пипеткой и засевают на среду Китта -Тароцци.

Третий день. Проводят отбор изолированных колоний на среду Кита -Тароцци для накопления чистой культуры. Изучают морфологию бактерий, колоний, биохимические свойства.

Четвертый день. Учет полученных результатов.

5.3. Среды для культивирования анаэробов

Железо - сульфитный агар (среда Вильсон-Блера)

Состав среды: 2% МПА с 1% глюкозой, 20% сульфитом натрия и 8% хлорида железа (II- валентного). Посев проводят в глубину столбика регенерированной среды. Черные колонии образуются за счет восстановления сульфита натрия в сульфат натрия, который соединяясь с двухвалентным хлоридом железа образует черный осадок сульфата железа (Fe S). Clostridium perfringens (возбудитель газовой гангрены) образует черные колонии через 1-2 часа, другие анаэробы через 6-18 часов образуют зеленовато-черные колонии.

Среда Китта- Тароцци

Состав среды: бычья печень (белок куриного яйца) в трехкратном объеме питательного бульона кипятят 30 минут. Мясо подсушивают, бульон фильтруют. 3-4 кусочка бычьей печени соединяют с 7-8 мл 0,5% сахарного (глюкоза) бульона, стерилизуют.
Посев проводят в глубину регенерированной среды, сверху заливают стерильным парафином, пробку так же парафинируют. При росте анаэробов наблюдается бурное газообразование, изменение pH в кислую сторону, рост микроорганизмов на дне пробирки.

5. Асептика, антисептика, дезинфекция

5.1. Методы стерилизации

В микробиологической практике самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации — обеспложивания (sterilis—бесплодный), освобождения от зародышей микроорганизмов в разнообразнейших объектах—является применение высокой температуры. Существуют различные способы стерилизации при помощи высокой температуры.

1. Прокаливание на огне (газовая горелка или спиртовка) — самый быстрый и верный способ стерилизации, но, так как при нем портятся стерилизуемые предметы, он имеет ограниченное применение. Прокаливанием стерилизуют петли и иглы для посевов, предметные стекла, мелкий инструментарий.

2. Кипячение—простейший способ стерилизации, **не** всегда, однако, гарантирующий полное обеспложивание, **если в** стерилизуемом материале находятся споры бактерий. Кипячением в воде в течение 10—15 минут стерилизовали инструменты (с добавлением 1% соды), шприцы, иглы.

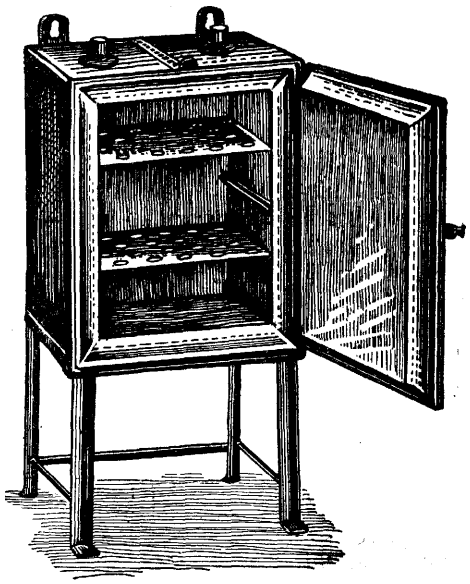


Рис. 36. Печь Пастера для стерилизации сухим жаром.

3. Стерилизация сухим жаром производится в особых аппаратах — печах Пастера или сухожаровых шкафах. Печь Пастера (рис. 36) представляет собой металлический шкаф с двойными стенками (между которыми проходит горячий воздух) и металлическим дном, покрытый снаружи асбестом или линолеумом для удержания тепла. Сверху через отверстие в крышке вставлен термометр, опускающийся внутрь аппарата. Внизу, под дном, помещается большая горелка (или трехрожковый примус) или электрический нагревательный прибор.

Приготовленный соответствующим образом материал ставят в печь и стерилизуют в течение *60 минут при температуре 180°*, считая с того момента, когда ртуть в термометре поднимается до этой температуры. Во время стерилизации пламя горелки должно быть отрегулировано так, чтобы температура 180° оставалась постоянной на все время стерилизации, так как выше 170° начинается обугливание бумаги, а при более низкой температуре требуется больший срок стерилизации (при 150° не менее 2 часов).

Сухим жаром стерилизуют всю стеклянную посуду (чашки Петри, пробирки, пастеровские пипетки), вату и марлю в маленьких бумажных пакетах. Перед стерилизацией посуда должна быть вымыта, высушена и завернута в бумагу. Пробирки, колбы, флаконы закрывают ватными пробками. Пробки ставят в проволочные сетки или завертывают в бумагу по 10—15 штук, горлышки колб обвязывают бумажными колпачками; чашки Петри завертывают в бумагу по одной штуке, пастеровские пипетки — по 5—10 Штук,

градуированные пипетки—по 1—3 штуки. Критерием достаточной стерилизации является легкое пожелтение бумаги, в которую завернуты стерилизуемые предметы.

Можно стерилизовать пипетки и чашки в особых металлических футлярах. По окончании стерилизации печь открывают только после того, как она остынет, в противном случае, вследствие резкой перемены температуры, стеклянные предметы могут лопнуть.

4. Стерилизация паром не требует такой высокой температуры, как стерилизация сухим жаром, ибо пар действует на микробов сильнее; поэтому обеспложивание с помощью пара производится при температуре в 100—120°. Существует два способа обеспложивания паром: 1) стерилизация насыщенным паром под давлением, 2) стерилизация текучим паром.

1) Стерилизация паром под давлением — самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание, включая и спороносные бактерии. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипении воды пар не выходит наружу, а, скопляясь в замкнутом пространстве, повышает давление. Соответственно давлению повышается и температура кипения воды; при повышении давления на 1 атм. температура кипения будет равна 120°, при повышении давления на 2 атм.— 134,18° и т. д. При такой температуре микроорганизмы и их споры погибают очень быстро (при 120° в течение 15—20 минут).

Этим способом стерилизации пользуются для обеспложивания питательных сред (за исключением тех, которые не выносят высокой температуры, например, с добавлением углеводов) 1 атм. 20-30 мин; посуды, инструментов – 1,0 атм 45 мин и т. д., а также для обеззараживания инфекционного материала (культуры, трупы подопытных лабораторных животных и т. д. 1,5 атм. 25 мин).

Стерилизация паром под давлением производится в автоклавах.

5.2. Автоклав

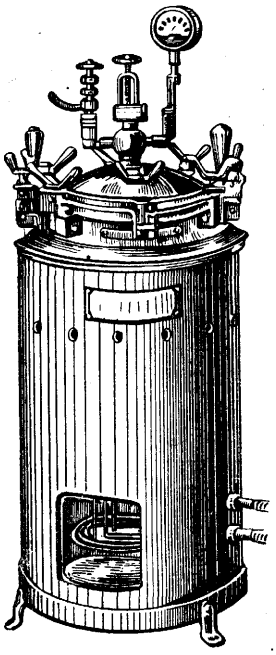


Рис. 37. Автоклав.

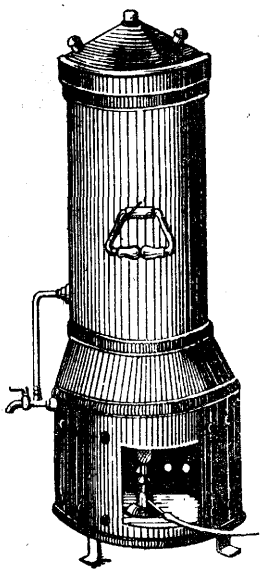


Рис. 38. Текучепаровой аппарат.

Автоклав (рис.37) представляет, собой прочный цилиндрический медный котел на ножках, с толстыми двойными стенками и с герметически закрывающейся при помощи особых винтов массивной крышкой. На крышке (или сбоку) находится манометр, предохранительный клапан и выпускной кран. Под дном автоклава помещаются горелки (или примус, или электрическая проводка). На дно автоклава наливают воду; над ней на подставке помещают в проволочных сетках стерилизуемые предметы и закрывают крышку, сначала не завинчивая ее герметически. Зажигают горелки и доводят воду до кипения; образующийся при этом пар выходит через выпускной кран: сначала идет прерывистой струёй пар вместе с воздухом. Когда весь воздух вытеснен и выделяется непрерывная струя пара, герметически завинчивают крышку и закрывают выпускной кран; пар оказывается в замкнутом пространстве, и начинается повышение давления и температуры. Когда манометр покажет нужную высоту давления (1 1/2—2 атм.), регулируют пламя горелки так, чтобы это давление держалось 15—20 минут (при стерилизации материалов в больших объемах (питательные среды, хирургические материалы) время увеличивают до 2 часов), после чего гасят горелки и ждут, пока стрелка манометра не упадет до 0. Только после этого открывают выпускной кран, отвинчивают и снимают крышку автоклава. Если открыть автоклав раньше, чем стрелка манометра дойдет

до 0, то, вследствие быстрого падения давления, стерилизуемая жидкость закипит, вытолкнет пробки и выплеснется из сосудов.

Нужно иметь в виду, что на манометрах обычно принято обозначать в атмосферах только избыточное давление, причем нормальное атмосферное давление (760 мм ртутного столба) считается равным 0.

Предохранительным клапаном автоклав снабжается на тот случай, если давление достигнет предела: тогда клапан автоматически открывается и вырывающаяся со свистом струя пара "предупреждает" о необходимости немедленно прекратить нагрев автоклава, чтобы давление больше не повышалось (автоклав может взорваться).

Стерилизация текучим паром производится в *аппарате Коха* (рис. 38), представляющем собой высокий металлический цилиндр, обложенный снаружи асбестом или линолеумом, с двойным дном и неплотно закрывающейся крышкой, снабженной термометром. На дно аппарата наливают воду, подогреваемую снизу до кипения горелками. Образующийся пар выделяется через края неплотно закрытой крышки. Стерилизацию производят в течение 30—40 минут с момента выделения пара.

Стерилизацию текучим паром можно производить также и *в автоклаве*; в таком случае крышка автоклава остается незавинченной, а выпускной кран открытым; пар выделяется через щель между крышкой и автоклавом и через выпускной кран. Время, нужное для стерилизации, отмечается с момента выхода непрерывной струи пара, когда температура достигает 100°.

Текучим паром стерилизуют предметы, портящиеся от действия высокой температуры (питательные среды с углеводами, желатина).

Однократная стерилизация текучим паром не обеспечивает полного обеспложивания стерилизуемых объектов, так как при температуре в 100° (текучий пар) гибнут вегетативные формы, но не споры бактерий. Полное обеспложивание при помощи текучего пара достигается лишь при повторных стерилизациях; этот метод носит название "дробной стерилизации".

Дробная стерилизация. Дробной стерилизации подвергаются материалы, портящиеся от сухого жара и продолжительного действия пара, не переносящие температуры выше 100° (желатина, молоко, питательные среды с углеводами). В основу метода дробной стерилизации положен следующий принцип. Умерщвляя при температуре в 100° вегетативные формы бактерий, дают оставшимся спорам прорасти в вегетативные формы. Через сутки снова стерилизуют материал при 100°. Оставшимся в меньшем количестве спорам снова дают прорасти и через сутки снова стерилизуют материал при 100°. Обычно после третьей стерилизации при 100° материал оказывается освобожденным от бактерий и спор.

Стерилизация текучим паром при 100° производится в текучепаровом аппарате Коха или в автоклаве 3 дня подряд по 1 часу минут. В промежутках стерилизуемый материал находится при комнатной температуре; за этот срок споры должны прорасти в вегетативные формы, которые уничтожатся последующим нагреванием до 100°.

Тиндализация представляет собой дробную стерилизацию при низкой температуре, предложенную Тиндалем для объектов, не переносящих температуры в 100°. Их подвергают нагреванию в течение 5—6 дней подряд при более низкой температуре (например, для белковых жидкостей при 56—58°) по 1 часу ежедневно (в первый день в течение 2 часов). Полагают, что в промежутки между нагреваниями, если жидкость хранится при комнатной температуре, споры успевают прорасти в вегетативные формы, которые умерщвляются последующим нагреванием.

Тиндализация производится или на водяных банях, или в специальных приборах с терморегуляторами.

Пастеризация. Этот метод был предложен Пастером для **частичного** (но не полного) обеспложивания жидкостей, теряющих **свои качества под** действием высокой температуры (молоко, вино и т. д.), предотращается порча продукта, но сохраняется энергетическая и пищевая ценность.

Способ основан на том, что при нагревании жидкости до 50—60° в течение 15—30

минут или до 70—80° в течение 5—10 минут погибает большинство бесспоровых микробов (в том числе патогенные — холерный вибрион, брюшнотифозная палочка), споры же, если они содержатся в данной жидкости, остаются жизнеспособными. Поэтому во избежание **их** прорастания пастеризованный продукт необходимо хранить на холоду.

В бактериологической практике пастеризация при 90° применяется нередко для разделения спороносных и не споровых видов бактерий.

Стерилизация фильтрованием. Механический способ фильтрации как способ освобождения от микробов употребляется в тех случаях, когда материал не может быть подвергнут нагреванию (например, сыворотки, ряд лекарственных веществ и т. д.).

Для этой цели изготовляются фильтры с настолько мелкими порами, что они не пропускают микробов (последние задерживаются поверхностно-активными силами адсорбента на фильтре). Фильтры изготовляются из мелкопористых веществ: инфузорной земли, фарфора, каолина, асбеста. Они готовятся в виде цилиндрических свечей (фильтр Шамберлана, Берке-фельда) или асбестовых пластинок (фильтр Зейтца, рис. 39).

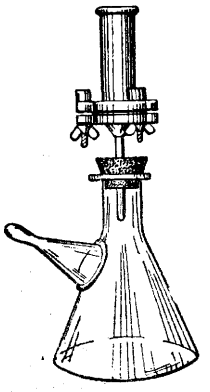


Рис. 39. Фильтр Зейтца.

Фильтрование производится или под повышенным давлением, вследствие чего жидкость нагнетается через поры фильтра в приемник, или же создается разрежение в приемнике и тогда жидкость всасывается в него через фильтр.Поэтому к фильтрующему прибору присоединяется или нагнетающий, или разрежающий насос.

Наиболее простым способом является фильтрование с помощью водоструйного насоса: в приемнике создается отрицательное давление и жидкость всасывается через фильтр. Стерильность профильтрованной жидкости проверяется путем **ее** посева на питательную среду - посев остается стерильным.

Разумеется, прибор для фильтрования (фильтр, приемник) должен быть предварительно простерилизован в автоклаве.

Для ознакомления с методом можно профильтровать бульонную культуру каких-либо бактерий и произвести посев полученного прозрачного фильтрата.

Действие высокой температуры **на** бактерий.

Из всех физических факторов наиболее губительно влияет на микробов высокая температура. Под действием высокой температуры протоплазма микробов изменяется и они погибают.

Вегетативные формы патогенных микробов погибают при 50—60° в течение 30 минут, а при 70°—в течение 5—10 минут. Споры же бактерий обладают большой устойчивостью к высоким температурам, что объясняется малым содержанием в них воды и плотностью оболочки. Однако при воздействии температуры в 120° в течение 15—20 минут можно достигнуть умерщвления и спор. Для того чтобы убедиться в губительном действии высокой температуры на бактерии и их споры, можно проделать следующий опыт. В трех пробирках с небольшим количеством физиологического раствора приготовляют взвесь бактерий: в одной пробирке—без спорового вида, например, вибриона Мечникова, в двух остальных — спороносной бактерии, например, сенной палочки. Пробирку с вибрионом и одну из пробирок с сенной палочкой подвергают кипячению в течение 10 минут; при этом погибают все вегетативные формы бактерий, споры же остаются невредимыми. Для того чтобы погибли и споры, вторую пробирку с взвесью сенной палочки стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 15—20 минут. После этого для проверки действия температуры на бактерии из всех пробирок делают посевы на агар штрихом и помещают их в термостат на сутки.

На следующий день при рассмотрении посевов оказывается, что пробирка, засеянная вибрионом Мечникова, осталась стерильной, так как при кипячении все бактерии погибли. Посев из взвеси сенной палочки, подвергнутой кипячению, дал рост, так как при 100° не погибли споры. Посев из второй пробирки с сенной палочкой, стерилизовавшейся в автоклаве, остался стерильным, так как при температуре в 120° погибли и споры бактерий.

5.3. Контроль работы стерилизующей аппаратуры

1. Физический метод. Температуру, давление проверяют по приборам вмонтированным в аппарат (термометры, манометры). Один раз в год средства измерения поверяются.
2. Физико- химический. Помещают на разных уровнях полоски бумаги с нанесенным веществом, имеющим температуру плавления равную температуре стерилизации с добавлением красителя (индикаторы стерилизации). После стерилизации наблюдают изменение цвета индикатора согласно эталону. В настоящее время используют термовременные индикаторы стерилизации – химическое вещество плавится при достижении температуры стерилизации и выдержанной экспозиции (времени стерилизации): ИС 180°- 1 час, ИС 120°- 20 мин. Химические вещества использующиеся в качестве индикаторов:
- антипирин - температура плавления 115° или 0,5 атм.
- бензойная кислота – 121° или 1,0 атм.
3. Биологический. Используют флаконы с высушенной споровой культурой в определенной концентрации (биотесты). Биотесты укладывают на разные уровни стерилизующей аппаратуры. После стерилизации в обычном режиме флаконы заливают жидкой питательной средой с индикатором pH. Инкубируют 7 суток при 37°. При неэффективной работе стерилизатора наблюдается помутнение и изменение цвета среды.
4. *Посев на стерильность*. Выборочный высев стерильного хирургического и мягкого материала на жидкие питательные среды для роста факультативно- анаэробной и анаэробной флоры. Инкубируют 7 суток при 37°. При неэффективной стерилизации – рост.

5.4. Опыт дезинфекции

А. Приготовление бактериальных тестов для испытания действия дезинфицирующих веществ. Белую хлопчатобумажную ткань стирают обычным способом, помещают в спирт на 30 минут, отжимают, прополаскивают, сушат и проглаживают, затем разрезают на прямоугольники (длиной 1 см, шириной 0,5 см), которые помещают в чашки Петри и стерилизуют.

Суспензия микробов (золотистый стафилококк, кишечная палочка, антракоид) для заражения тестов: готовят двухмиллиардную взвесь суточной агаровой культуры стафилококка или кишечной палочки; взвесь антракоида приготовляют из культуры, содержащей большое количество спор.

Кусочки ткани помещают в суспензию микробов на 20—25 минут, после чего извлекают, подсушивают между листами стерильной фильтровальной бумаги, а затем 15—20 минут в термостате.

Срок годности тестов, зараженных стафилококком и кишечной палочкой, 2—3 дня, споровой взвесью— 10 дней.

Б. Испытание действия дезинфицирующих веществ. Тесты помещают в дезинфицирующий раствор (5% раствор карболовой кислоты, 5% раствор лизола, 10—20% взвесь хлорной извести), причем на каждый тест должно быть не менее 3 мл раствора, а на каждую экспозицию не менее трех тестов. Время испытания — от 5 минут до 1 часа.

Из дезинфицирующего раствора тесты после экспозиции переносят в стерильную промывную воду и держат их по 5 минут в двух промывных водах. После промывания тест помещают в пробирку с бульоном. Посевы выдерживают в термостате 6—8 дней для стафилококка и кишечной палочки и 21 день для споровых культур. При появлении роста производят высев **на** простой агар (для стафилококка и антракоида) и на среду Эндо (для кишечной палочки).

Контроль — посев тестов, не подвергшихся действию дезинфицирующих веществ.

6. Антибиотики

6.1. Определение чувствительности микробов к антибиотикам

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и другим химиопрепаратам определяется двумя группами методов:

- *диско - диффузионным*. На поверхность подсушенной среды АГВ в чашке Петри наносят 0,1 мл исследуемой суточной культуры в концентрации 10^8. растирают шпателем. Избыток жидкости удаляют пипеткой. Чашки подсушивают 15-20 мин до полного высыхания агара. Диски с антибиотиками накладывают пинцетом на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки (на 1 чашку не более 6 дисков). Чашки ставят в термостат вверх дном и инкубируют при 37°С 18-20 часов. При учете замеряют линейкой диаметр задержки роста вокруг дисков (должен быть не менее 20 мм).

- *серийных разведений антибиотика в питательной среде.* Порошок антибиотика взвешивают и растворяют в стерильной дистиллированной воде до определенной концентрации, например 2000 мкг/мл (ЕД/мл). Готовят ряд пробирок. Кроме первой во все вносят по 1 мл питательного бульона. В первую пробирку вносят 2 мл раствора антибиотика с концентрацией 256 ЕД/мл (2 мл раствора АБ 2000 ЕД/мл + 13,62 мл бульона). Отдельными пипетками переносят по 1 мл раствора антибиотика из 1-ой пробирки во вторую, уз 2-ой – в третью, из 3-ей – в четвертую и т.д. Из предпоследней пробирки 1 мл удаляют. В последнюю пробирку антибиотик не добавляют – контроль. Получают двукратные разведения антибиотика от 256 ЕД/мл, 128 ЕД/мл и т. д. до 0,25 ЕД/мл. В каждую пробирку вносят по 1 мл культуры в концентрации 10^6 микробных тел/мл. посевы инкубируют при 37°С до появления роста в контроле (24 часа). Отмечают последнюю пробирку (максимальное разведение) с задержкой роста микробов (прозрачная питательная среда) – это минимальная ингибирующая концентрация (**МИК** в ЕД/мл). Терапевтическая концентрация (**ТК**) равняется удвоенной МИК (т. е. предыдущее разведение антибиотика).

№ пробирки	Концентрация антибиотика ЕД/мл	Исследуемая культура, мл	Рост бактерий (помутнение среды)
1.	256	1,0	-
2.	128	1,0	-
3.	64	1,0	-
4.	32	1,0	-
5.	16	1,0	-
6.	8	1,0	-
7.	4	1,0	-
8.	2	1,0	+
9.	1	1,0	+
10.	0,5	1,0	+
11.	0,25	1,0	+
12.	-	1,0	+ контроль

МИК составляет 4 ЕД/мл, ТК- 8 ЕД/мл.

- *ускоренные методы определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам.* Используют автоматизированные системы. В кюветах панели содержаться деградированные

субстраты или диски антибиотиков в определенных концентрациях, соответствующих критерию принадлежности бактерий к группе «чувствительных» к антибиотику (МИК). Одновременно тестируется 20 и более антибиотиков. Вносят в кюветы взвесь испытуемых микроорганизмов. Инкубируют при 37°С в течение 4-5 часов. Учет проводят спекрофотометрически по оптической плотности роста микроорганизма без антибиотика в контроле.

7. Микрофлора человеческого тела

Все поверхности и полости тела человека, соприкасающиеся с внешней средой, заселены микроорганизмами. Размножение последних зависит от условий, в которых оказываются микробы в той или иной области организма человека. Так, на коже и на слизистых количество их невелико, а в кишечнике огромно. Интенсивность их размножения зависит от наличия питательных веществ; в то же время происходит очищение организма от микробов при помощи факторов защиты; последние являются препятствием и для проникновения микробов в организм.

Посев с пальцев рук. Убедительным, хотя и грубым доказательством загрязненности кожи может служить посев “отпечатков” пальцев, полученный путем прикосновения пальцев к агару в чашке Петри. Чашки ставят в термостат на 24 часа, затем выдерживают в течение 2—3 суток при комнатной температуре.

На чашках обнаруживается обильный рост микробов — главным образом стафилококков, сарцин, коринебактерий, стрептококков, бацилл, плесневых и дрожжевых грибков. Попав на кожу из внешней среды (воздух, вода, предметы, выделения человека), микробы не находят здесь благоприятных условий и не размножаются, но все же количество их достаточно велико — 10^2-10^4 микроооганизмов на площади кожи в 1 $см^2$.

Посев из зева. Слизь из зева забирают при помощи стерильного ватного тампона, закрепленного в пробке стерильной пробирки. Делают посев этим же тампоном штрихами на чашку с кровяным агаром. После суток инкубации при 37° из выросших колоний приготовляют препараты, которые окрашивают по Граму. На слизистых зева у здорового человека нередко встречаются Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp., Leptotricha bucalis, Vielonella spp., Bacteroides spp., Candida spp., Neisseria spp., Treponema skoliodontum, Mycoplasma spp.

Посев испражнений. Испражнения разводят в пробирке физиологическим раствором в 10 раз. После отстаивания берут петлей с поверхности жидкости каплю и производят посев штрихом на чашку с простым со средой Эндо (для энтеробактерий), ЖСА (для стафилококков), кровяной агар (для стрептококков и выявления гемолитических форм других микроорганизмов), бифидум - агар (для бифидумбактерий), среду Вильсон-Блера (для клостридий), среду Сабуро (для плесневых и дрожжеподобных грибов), энтерококк-агар (для энтеробактерий), лактоагар (для лактобактерий). После суток роста при 37° приготовляют мазки из колоний, окрашивают по Граму, микроскопируют, идентифицируют.

Состав микрофлоры толстого кишечника:

1. Строгие анаэробы, не образующие спор грамположительные (бифидумбактерии) и грамотрицательные (бактероиды) палочки - 96-99% всей микрофлоры;
2. Факультативные анаэробы – кишечная палочка, энтерококки, лактобактерии – 1-4%;
3. Остаточная микрофлора – стафилококки, протей, дрожжи, клостридии – 0,01-0,001%;
4. Различные представители семейства Enterobacteriaceae.

8. Распространение микроорганизмов в природе

8.1. Микроорганизмы и внешняя среда

Неотъемлемым условием существования микроорганизмов является непрерывное

взаимодействие их с внешней средой. В медицинской практике широко пользуются различными факторами внешней среды, оказывающими и благоприятное, и неблагоприятное воздействие на микроорганизмы. Например, обеспечение для практических целей размножения микробов и, наоборот, их уничтожение основаны в значительной степени на применении тех или иных факторов воздействия на них; на этом же основано и направленное изменение свойств микробов для использования их в практике.

Огромное влияние на жизнедеятельность микробов оказывают факторы физические, химические и биологические.

Из физических факторов самое широкое применение получило воздействие высокой температуры для уничтожения микроорганизмов. Действие химических веществ используется для дезинфекции — уничтожения патогенных микробов. В лабораторной практике нередко применяются элективные питательные среды с прибавлением химических веществ, обладающих подавляющим действием на размножение одних микробов и не препятствующих росту других.

Действие света на бактерий

Свет оказывает на патогенных микробов губительное действие. Рост и размножение их происходят только в темноте. Рассеянный свет оказывает меньшее влияние, прямые же солнечные лучи убивают микробов в течение нескольких часов (поэтому культуры следует сохранять в темноте). Губительнее всего действуют на микробов лучи с короткой волной и с наибольшим фотохимическим действием (ультрафиолетовая, фиолетовая и голубая часть спектра).

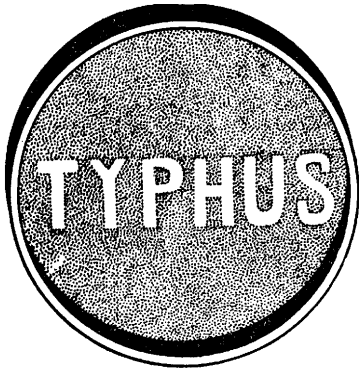


Рис. 49. Действие света на бактерий.

Действие света на бактерий доказывается следующим опытом.

В чашку Петри с тонким слоем агара производят обильный посев культуры, например, кишечной палочки или какой-либо другой. Затем на агар накладывают буквы, вырезанные из черной бумаги и предварительно простерилизованные, образующие какое-либо слово (например, typhus). Открытая чашка, обращенная к свету, подвергается в течение 1—1/2 часов действию прямых солнечных лучей, после чего бумажные буквы снимают и ставят чашки на сутки в термостат: рост культуры в виде белого налета произойдет только на тех местах питательной среды, которые были защищены черными буквами от действия солнечных лучей, тогда как вся остальная часть агара останется прозрачной: посеянные здесь бактерии, подвергшиеся действию света, погибли (рис. 49).

8.2. Микробы в окружающей среде

Повсеместное распространение микробов в природе и в окружающей среде имеет огромнейшее и разнообразное значение. С одной стороны, микробам принадлежит важнейшая роль в тех процессах, которые имеют решающее значение для существования жизни на земле (круговорот веществ в природе);

Велика роль микробов и в разнообразных отраслях промышленности и сельского хозяйства. С другой стороны, наличие патогенных микробов в окружающей среде является источником заражения человека, животных и растений и, следовательно, побуждает к обеззараживанию объектов, окружающей среды, к разработке специальных мероприятий для борьбы с населяющими ее микроорганизмами.

Методы специальных бактериологических анализов для определения содержания микробов в воде, воздухе, почве, продуктах и т. д. изучаются в курсе гигиены. Однако в процессе практической работы микробиологу постоянно приходится учитывать присутствие микробов в окружающей среде, в связи с чем полезно ознакомиться с содержанием их в тех объектах, которые непосредственно связаны с любой рабочей манипуляцией, например, в воздухе, на пальцах рук и т. д.

Посев из воздуха. Содержание в воздухе бактерий проще всего определяется методом оседания по Коху. Чашки Петри с агаром оставляют открытыми на определенное время (10 минут – на общую микробную обсемененность, 45 минут – на стафилококк)), после чего закрывают их крышками, надписывают и помещают в термостат на сутки; затем их выдерживают при 37°С 24—48 часов. Осевшие из воздуха на питательный субстрат микробы дают рост разнообразных колоний, часто пигментированных. Количество колоний соответствует степени загрязненности воздуха: по приблизительному подсчету (Омелянский) на площадь в 100 $см^2$ в течение 5 минут оседают столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Этот способ посева дает только приблизительное представление о насыщенности воздуха микробами, точный же подсчет их ведется с помощью специальных методов. Основная масса микробов воздуха является сапрофитами (сарцины, Bact. prodigiosum, всевозможные пигментные микробы). Часто встречаются также стафилококки, реже стрептококки и др.

Посев воды. При взятии пробы воды для бактериологического анализа необходимо хранить ее от загрязнения посторонними микробами из внешней среды, для чего пробы исследуемой воды набирают в стерильную посуду, соблюдая определенные правила предосторожности. Посев должен производиться или непосредственно на месте взятия воды, или немедленно по прибытии в лабораторию. Количество воды для посева варьирует в зависимости от предполагаемой степени ее загрязненности — 1 мл или несколько десятых или сотых долей его.

Исследуемый объем воды вносят в стерильную чашку Петри, куда затем выливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45° агара и быстро смешивают их осторожным покачиванием чашки. Когда агар застынет, чашки помещают в термостат на 1 сутки или, (в случае исследования воды из открытых водоемов, оставляют на 2 суток) при комнатной температуре, после чего производят подсчет колоний .

Исследование воды на содержание в ней патогенных микробов производят по специальной методике, изложенной в соответствующих разделах (брюшнотифозные бактерии, холерный вибрион и др.). Микрофлора воды носит в общем случайный характер, хотя в ней имеются и некоторые постоянные виды, являющиеся естественными обитателями воды. Для санитарно-бактериологической характеристики исследуемой воды наибольшее значение имеет наличие в ней кишечной палочки.

8.3. Антагонизм микробов

В природных условиях различные виды микроорганизмов живут в ассоциациях, оказывая взаимное влияние друг на друга, зависящее как от свойств микробов, так и от окружающих условий. Одной из форм взаимодействия микробов является антагонизм — угнетающее влияние одного микробного вида на другой; оно выражается в задержке развития и гибели микроорганизмов, на которых микроб-антагонист оказывает свое действие.

Явление антагонизма в мире микробов известно давно (Мечников); антагонизм наблюдается среди многочисленных групп микробов и в настоящее время широко используется в медицинской практике в виде применения антибиотиков (продуктов жизнедеятельности микробов-антагонистов) для лечения и профилактики инфекционных болезней. Весьма активные антагонисты обнаруживаются в почве, воздухе, воде. При посеве исследуемого материала или смесей микробов присутствие микробов-антагонистов обнаруживается по светлым зонам, окружающим их колонии; эти зоны свидетельствуют о подавлении роста угнетаемого микроба, причем величина зоны угнетения определяет ту или иную степень активности антагониста. Имея в лаборатории изолированные штаммы микробов-антагонистов, можно произвести опыты для выявления антагонизма по следующей методике.

1. Чашку с мясо-пептонным агаром равномерно засевают шпателем суточной бульонной культурой угнетаемого микроба (например, стафилококка). Затем из чашки с агаром, предварительно засеянной антагонистом (например, актиномицетом), вырезают

вместе с агаром колонию антагониста и накладывают на первую засеянную чашку (колонией кверху). Эту чашку ставят в термостат при 37°. Результат учитывают через сутки — образуется стерильная зона.

2. На чашку с мясо-пептонным агаром посредине широкой полосой засевают суточную бульонную культуру антагониста (например, B. coli M-17). Через сутки перпендикулярно к посеву вплотную подсевают суточную бульонную культуру угнетаемого микроба (стафилококк, дизентерийная палочка). Результат учитывают через сутки пребывания в термостате — рост угнетаемого микроба отступает от полосы, засеянной антагонистом.

Контрольные вопросы к занятие № 5 «Анаэробы. Стерилизация и дезинфекция. Определение чувствительности к антибиотикам».

1. Механический метод культивирования анаэробов.
2. Физический метод культивирования анаэробов.
3. Химический метод культивирования анаэробов.
4. Биологический метод культивирования анаэробов.
5. Выделение чистых культур анаэробов.
6. Среды для культивирования анаэробов: среда Вильсон-Блера, Китта- Тароцци.
7. Методы стерилизации: прокаливание на огне, кипячение.
8. Методы стерилизации: стерилизация сухим жаром.
9. Методы стерилизации*:* стерилизация паром под давлением, текучим паром.
10. Методы стерилизации однократная и дробная стерилизация текучим паром.
11. Методы стерилизации: тиндализация, пастеризация.
12. Стерилизация питательных сред фильтрованием.
13. Контроль работы стерилизующей аппаратуры: физический, химический методы.
14. Контроль работы стерилизующей аппаратуры: биологический, посев на стерильность.
15. Определение чувствительности к антибиотикам диско – диффузионным методом.
16. Методом серийных разведений антибиотика в питательной среде.
17. Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам.
18. Состав микрофлоры толстого кишечника.

III. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

В разделе “Инфекция и иммунитет” изучаются сложные процессы, проявляющиеся в результате взаимодействия микро - и макроорганизма в виде двух связанных между собой явлений:

1) инфекции, представляющей собой комплекс процессов, возникающих в организме в ответ на проникновение и размножение в нем патогенных микробов, и

2) иммунитета — невосприимчивости организма.

“Под невосприимчивостью к заразным болезням надо понимать общую сумму явлений, благодаря которым организм может выдерживать нападение болезнетворных микробов” (Мечников).

1. Инфекция

1.2. Определение вирулентности микробов
1.3. Экзотоксины и эндотоксины

Некоторые виды патогенных микроорганизмов характеризуются образованием особых ядовитых продуктов, которые носят название токсинов.

Некоторые микробы (например, столбнячная и дифтерийная палочка) выделяют токсины в окружающую среду; эти токсины получили название *экзотоксинов*, или истинных токсинов. В то время как микроб, попадая в организм, остается на месте внедрения

(например, при дифтерии в миндалинах), выделяемый им экзотоксин распространяется по всему организму. При посеве токсигенных микробов на жидкую питательную среду в последней накапливаются продуцируемые ими экзотоксины.

У многих микробов токсины связаны с протоплазмой клетки, они называются *эндотоксинами*; такие токсины освобождаются только при гибели и распаде клеток. Эндотоксины можно также получить in vitro, но только применяя какие-либо химические или физические воздействия для разрушения микробной клетки и освобождения эндотоксинов из ее протоплазмы. Например, при обработке трихлоруксусной кислотой удалось из некоторых грамотрицательных бактерий получить глюцидолипоидополипептидный комплекс со всеми свойствами эндотоксина.

Патогенные микробы, обладающие способностью образовывать экзотоксины, являются возбудителями тяжелых заболеваний: столбняка, газовой гангрены, дифтерии, ботулизма, скарлатины, некоторых форм дизентерии и стрептококковых инфекций.

Единицы измерения вирулентности:

1.Dosis letalis minima (Dlm - минимальная смертельная доза) – наименьшая доза микроорганизма, которая при определенном способе заражения, в определенных условиях вызывает гибель около 95% подопытных животных одного пола, веса, возраста;

2. Dosis letalis 50% - (Dl_{50}) - доза микроорганизма, вызывающая гибель 50% зараженных животных;

3. Dosis certe letalis – (Dcl - наименьшая безусловная смертельная доза)- наименьшая доза микроба, которая является смертельной для всех 100% животных, взятых в опыт.

Для установления Dlm различные количества микробов вводят восприимчивым животным, причем способ введения (под кожу, внутрибрюшинно) заранее установлен. Dlm может определяться у культур, выросших как на жидкой, так и на плотной питательной среде. В первом случае (если имеется бульонная культура) предварительно стерильно производят ее десятикратные разведения а затем животным вводят определенный объем каждого разведения. При определении Dim агаровой культуры стерильно производят смыв роста физиологическим раствором, после чего взвесь микробов стандартизируют по оптическому стандарту и заражают животных различным количеством микробных тел.

Dlm различных микробов резко варьирует в зависимости как от их вида, так и от взятого в опыт штамма.

Определение Dlm бульонной культуры пневмококка

В ряд пробирок градуированной пипеткой наливают по 1,8 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 0,2 мл суточной бульонной культуры пневмококка и тщательно перемешивают. Получается разведение в 10 раз (10^{-1}). Затем 0,2 мл переносят из первой пробирки во вторую (разведение 10^{-2}), из второй в третью (10^{-3}) и т. д. до получения разведения пневмококка, равного 10^{-8}—10^{-9}. Каждое разведение готовят особой пипеткой. После этого производят внутрибрюшинное заражение мышей 0,2 мл данного разведения.

На каждую дозу пневмококка желательно брать по 3 мыши для большей достоверности результатов.

При проведении заражения животных одним и тем же шприцем необходимо начинать опыт с введения больших разведении культуры.

Определение Dlm агаровой культуры палочки Фридлендера

Постановка опыта начинается с получения взвеси палочки Фридлендера в физиологическом растворе, для чего в пробирку с выросшей на агаре культурой стерильно добавляют 1—2 мл физиологического раствора и вращением пробирки между ладонями или встряхиванием производят смыв микробов с агара. Суспензию микробов отсасывают в стерильную пробирку и стандартизируют по оптическому стандарту до содержания

определенного количества микробных тел в 1 мл. После этого в ряд стерильных пробирок наливают по 1 мл физиологического раствора, затем в первую пробирку вносят 1 мл стандартизованной микробной взвеси и путем переноса по 1 мл жидкости из первой пробирки во вторую, из второй в третью и т. д. готовят двойные разведения культуры. Приготовление разведений производится стерильно, причем каждое разведение приготовляют отдельной пипеткой с тщательным смешиванием вносимых микробов с физиологическим раствором.

После приготовления разведений производят заражение мышей, как это описано при определении Dlm пневмококка.

На следующем занятии путем учета погибших мышей с бактериоскопическим и бактериологическим исследованием трупа производят определение пневмококка и палочки Фридлендера.

Методы обнаружения экзотоксинов

in vitro:

1. Реакция преципитации в агаре. Применяется для определения токсигенности микроорганизма. На дно чашки Петри с питательным агаром укладывают полоску фильтровальной бумаги, размером 1,5Х8, смоченную антитоксином (антитоксической противодифтерийной сывороткой) с 500 АЕ/мл. На поверхность агара засевают в виде бляшек испытуемую культуру и контрольный токсигенный штамм на расстоянии от полоски 0,5 см, расстояние между бляшками – 0,5 см, диаметр бляшки 0,7 см. Учет проводится через 24-48 часов. Токсин из культур диффундирует в агар, где встречается с антитоксином, который диффундирует навстречу. На месте встречи антигена и антител образуется белая полоска преципитата в виде изогнутой лини.

2. Гемолизин определяют путем посева испытуемой культуры на чашку Петри с кровяным агаром. При наличие токсина вокруг колонии образуется зона гемолиза

3. *Определение титра О-стрептолизина* стрептококка группы А. Экзотоксин стрептококка (стрептолизин) обладает гемолитической активностью. Готовят ряд двукратных серийных разведений бульонной культуры β- гемолитического стрептококка. В каждую пробирку вносят равный объем 5% взвеси отмытых эритроцитов кролика. Инкубируют при 37°С в течение 1 часа. Учет результатов проводят по наличию гемолиза (красная прозрачная «лаковая» кровь) или по его отсутствию (осадок эритроцитов). Титр гемолитической активности – наибольшее разведение фильтрата бульонной культуры, при которой еще наблюдается гемолиз. *4. Цитотоксины* обнаруживают внесением фильтрата бульонной культуры бактерий в культуру клеток. При положительном результате наблюдается ЦПД: изменение формы, размеров клеток, появлением вакуолей в цитоплазме, нарушением клеточного монослоя и т.д.

на экспериментальных животных (in vivo):

5. Реакция нейтрализации экзотоксина антитоксической сывороткой на животных. В опыт берут 2 группы животных: контрольную (К) и опытную (О) по 4 особи. К исследуемому материалу содержащему экзотоксин (остатки пищевых продуктов, кровь, тканевая жидкость, иссеченная ткань и т.д.) приливают соответствующую антитоксическую сыворотку. Смесь выдерживают при 37С в течение 40 минут для связывания токсина. Опытной группе животных вводят приготовленную смесь, контрольной - исследуемый материал. Если антитоксическая сыворотка связывает (нейтрализует) токсин, то в опытной группе животные остаются живыми. В контрольной группе животные погибают.

Диагностика ботулизма. Экстракт пробы делят на 2 части. К одной добавляют поливалентную антиботулиническую сыворотку и смесь выдерживают 30-40 минут. Одной (О) группе мышей в/м или в/в вводят смесь, другой (К) – фильтрат пробы без антитоксической сыворотки. Заболевание и гибель животных наступает через 1-4 дней. Клиника: учащенное дыхание, расслабление и западение мышц брюшной стенки (осиная талия), судороги, паралич, затем гибель животного. Для определения типа токсина

(например, при ботулизме), одновременно с основным опытом 7 группам опытных животных вводят исследуемый материал смешанный с определенным типом антитоксической сыворотки (А, В,С, Д, Е, F). Остается живой та группа животных, которым ввели гомологичный токсину тип антитоксической сыворотки (например, А). Для каждой сыворотки берут отдельный шприц.

Определение Dim столбнячного экзотоксина. В ряд пробирок градуированной пипеткой стерильно наливают по 1 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 1 мл исходного разведения токсина (1:1 000—1 : 2000) и после перемешивания готовят двойные разведения его (до 1 : 8 000—1 : 16000). Каждое разведение готовят отдельной пипеткой. После приготовления разведения производят заражение мышей введением 0,2 мл токсина в мышцы бедра. При работе одним шприцем мышам сначала вводят большие разведения токсина, а затем меньшие.

Через 24 часа у животных начинают появляться первые признаки столбняка: спастические сокращения мышц хвоста и ближайших к месту введения токсина мышечных групп. Затем поражение распространяется на другие мышцы той же половины тела, после чего постепенно поражаются и мышцы противоположной стороны — развивается "восходящий столбняк", в 2—3 дня приводящий животное к гибели.

Наибольшее разведение токсина, вызвавшее гибель мышей, является его минимальной смертельной дозой.

6. Дермонекротическая проба. Внутрикожное введение морским свинкам дифтерийного токсина. Для иллюстрации наличия дермонекротического действия экзотоксинов морской свинке внутрикожно (туберкулиновым шприцем с тонкой иглой) вводят 1/50—1/100 Dim дифтерийного токсина в объеме 0,1—0,2 мл. Через несколько дней (2—4 дня) на месте введения образуется некроз.

7. Определение некротоксина производится путем внутрикожного введения лабораторному животному 0,2 мл бульонной культуры испытуемого микроба. Через 1-2 суток на месте введения образуется очаг некроза.

8. Кератоконъюнктивальная проба. Суточную агаровую культуру бактерий стандартной бактериологической петлей диаметром 5 мм вводят под нижнее веко морской свинке. Через 2-4 сут наблюдают выраженность кератоконъюнктивита: степень помутнении, нагноения, изъязвления роговицы.

9. Определение вирулентности бактерий и токсичности. Испытуемые культуры или токсины в десятикратных разведениях вводят отдельным группам животных. Отмечают число погибших в каждой группе животных и производят расчет DL_{50}, вызвавший гибель 50% животных.

10. Определение Dlm брюшнотифозного эндотоксина. Для определения Dlm брюшнотифозного эндотоксина берут заранее приготовленный глюцидолипоидополипептидный комплекс. Мышам внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл эндотоксина в разведениях 1:2, 1: 4, 1: 8 и т. д. Минимальная смертельная доза эндотоксина, так же как и экзотоксина, определяется его наибольшим разведением, вызвавшим гибель определенного вида животных. Однако при введении животным эндотоксина клиническая картина заболевания не является специфичной для данного вида микробов, приводя животное к гибели через 24—96 часов без наличия характерных клинических и патологоанатомических признаков. Следует обратить внимание также на значительно меньшую ядовитость эндотоксинов в сравнении с экзотоксинами.

Практическое применение экзотоксина:

- для получения анатоксинов;
- для получения антитоксических лечебных сывороток;
- для постановки внутрикожной пробы с целью выявления иммунитета у здоровых людей (реакция Дика при скарлатине, реакция Шика при дифтерии).

Приготовление анатоксина

Анатоксин — это токсин, лишенный своих ядовитых свойств, но сохранивший иммуногенность (антигенность). Для получения анатоксина используют сильный экзотоксин. Токсигенная культура бактерий выращивается в течение 7 дней на жидкой среде и фильтруется через бактериальные фильтры. К экзотоксину, налитому во флакон или колбу, добавляют 0,3—0,4% формалина, после чего флакон тщательно закрывают и помещают в термостат при температуре 37—40° на 18—30 дней до полного обезвреживания. Полученный анатоксин контролируют на безвредность путем введения его морским свинкам, а также на стерильность и иммуногенность.

3.6. Определение ферментов (факторов) патогенности

1. *Гиалуронидаза* гидролизует гиалуроновую кислоту, которая перестает давать с уксусной кислотой сгусток муцина. В пробирку с субстратом, содержащим гиалуроновую кислоту вносят суточную культуру бактерий, инкубируют 15 минут при 37°С. затем добавляют 2-3 капли крепкой уксусной кислоты. В пробирках, где происходит разрушение гиалуроновой кислоты, не происходит образования сгустка.

2. *Плазмокоагулаза.* Испытуемую культуру вносят в 0,4 мл стерильной цитратной плазмы крови кролика. Инкубируют при 37°С в течение 4-18 часов. При наличии фермента у бактерий происходит свертывание плазмы, в контроле она остается жидкой.

3. Лецитиназа. Выявляется при посеве на агар с желтком куриного яйца (ЖСА для стафилококков). Учет через 18 часов при 37°С. Фермент разрушает лецитин куриного желтка и вокруг колоний образуется зона помутнения с перламутровым блеском.

4. Обнаружение капсулы микроскопическим методом.

5. *Выявление корд - фактора* микобактерий туберкулеза (метод Прайса). Выращивают микобактерии на предметных стеклах, обработанных серной кислотой и погруженных в стаканчик с жидкой средой на основе цитратной крови. После инкубации стекла окрашивают по Циль-Нильсену. Микобактерии вирулентных штаммов растут в виде переплетенных тяжей, кос.

6. Выявление адгезии бактерий. Мазки со слизистой оболочки пораженных органов окрашивают по Романовскому-Гимзе. Бактерии в большом количестве прикрепляются к мембране эпителиальных клеток (ключевые клетки).

7. *Незавершенный фагоцитоз.* При микроскопии наблюдается большое количество не разрушенных микроорганизмов, расположенных внутри профессиональных фагоцитов.

Контрольные вопросы к занятию № 6 «Инфекция, её виды. Патогенность и вирулентность микроорганизмов»

1. Инфекция, инфекционный процесс, инфекционная болезнь.
2. Мутализм, комменсализм, паразитизм.
3. Формы инфекции по природе и локализации возбудителя.
4. Формы инфекции по повторному заболеванию, продолжительности, выраженности симптомов
5. Формы инфекции по клиническому течению: абортивная, дремлющая, типичная.
6. Формы инфекции по клиническому течению: атипичная, персистентная (хроническая), медленная, микст-инфекция, оппортунистическая (вторичная).
7. Динамика развития инфекционного процесса.
8. Источники инфекции.
9. Персистенция.
10. Патогенность и вирулентность – определения, критерии патогенности.
11. Факторы патогенности: адгезии, колонизации.
12. Факторы патогенности: ферменты инвазии.
13. Факторы патогенности: факторы защиты.
14. Факторы патогенности: синтез токсинов.

15. Свойства экзотоксинов.
16. Классификация экзотоксинов по механизму действия.
17. Практическое применение экзотоксина.
18. Единица измерения экзотоксинов.
19. Методы обнаружения экзотоксинов in vitro.
20. Методы обнаружения экзотоксинов in vivo.
21. Приготовление анатоксина.
22. Определение ферментов патогенности.
23. Свойства эндотоксина.

2. Физиологические механизмы естественного иммунитета

2.1.Влияние внешней среды на видовой иммунитет

Одним из факторов, влияющих на иммунологическое состояние организма, является внешняя среда, находящаяся в единстве с организмом. Влияние изменения внешней среды на состояние реактивности организма доказывается классическим опытом Пастера по заражению кур сибирской язвой при их охлаждении.

Влияние температурного фактора на изменение видового иммунитета может быть продемонстрировано опытом введения лягушкам столбнячного токсина при различной температуре. Известно, что лягушки весьма резистентны к действию токсина. В обычных лабораторных условиях (температура 18—22°) для получения смертельной столбнячной интоксикации необходимо ввести внутримышечно не менее 400—500 Dlm токсина для мышей. Однако эта доза может быть уменьшена до 20—40 Dlm при содержании лягушек при повышенной температуре — 37°.

Постановка опыта

Двум лягушкам в мышцы бедра вводят по 20—40 Dim столбнячного токсина в объеме 0,2 мл. Затем одну из них помещают при температуре 37°, а другую — в обычные условия. Через 1—3 дня у лягушки, находящейся при температуре 37°, развивается клиническая картина столбняка (повышенная возбудимость, судороги), вскоре заканчивающаяся ее гибелью. У контрольной лягушки симптомов столбняка нет.

2.2. Фагоцитоз

Фагоцитозом (от phagein — пожирать, cytos — клетка) называется поглощение клетками каких-либо частиц с последующим их перевариванием (в большинстве случаев). Фагоцитоз микробов — защитное приспособление организма.

Открытие этого явления и создание первой теории иммунитета как защитной реакции целостного организма принадлежат И. И. Мечникову.

Клетками фагоцитами являются лейкоциты (гранулоциты и моноциты), а также фиксированные клетки ретикуло-эндотелиальной ткани. Многих микробов лейкоциты способны фагоцитировать самостоятельно; наиболее же вирулентные микробы фагоцитируются только при участии антител — опсонинов и тропинов.

Gрисутствие иммунной сыворотки способствует усилению фагоцитоза, и по степени фагоцитоза можно судить о состоянии защитной способности организма (определение опсонического индекса).

Опыт фагоцитоза

Для изучения явления фагоцитоза ставятся следующие опыты.

1. За 2—3 часа до опыта в брюшную полость мыши вводят 2—3 мл стерильного мясо-пептонного бульона. По истечении этого времени в брюшной полости наблюдается скопление огромного количества лейкоцитов, что является результатом их положительного

хемотаксиса к пептону. В брюшную полость мыши вводят шприцем с тонкой иглой 0,5—1 мл очень густой суспензии в физиологическом растворе живых стафилококков (или других бактерий). Через 8—10 минут в брюшную полость вводят конец капилляра пастеровской пипетки (еще лучше оттянутый на пламени волосок капилляра). Из брюшной полости быстро набирают в пипетку мутно- белую жидкость — взвесь лейкоцитов; из капли этой жидкости делают тонкий мазок на предметном стекле, высушивают его на воздухе и фиксируют в жидком фиксаторе. Окрашивают мазок разведенной вдвое метиленовой синькой, причем делают это очень быстро: наливают краску и сейчас же ее смывают.

Под микроскопом в мазке видно множество лейкоцитов; в их протоплазме, окрашенной в бледно-голубой цвет, видны фагоцитированые стафилококки, окрасившиеся в синий цвет

2. Определение опсонического индекса. Для определения опсонического индекса необходимы:

1) лейкоциты животного, полученные из дефибринированной крови;

2) густая взвесь бактерий (7—8 млрд. в 1 мл);

3) исследуемая сыворотка, содержащая антитела к данному микробу;

4) нормальная сыворотка.

Берут две пастеровские пипетки, в капилляр каждой набирают до метки бактериальную взвесь, затем до этой же метки лейкоциты, затем сыворотку (в одну пипетку берут иммунную сыворотку, в другую — нормальную). Выдувают содержимое каждого капилляра на часовое стекло, тщательно перемешивают втягиванием в пипетку и выдуванием из нее. Затем набирают смесь в пипетку, запаивают капилляр и помещают его в термостат на 30 минут. После этого отламывают концы капилляров и берут по капле смеси для приготовления мазков. Мазки фиксируют в жидком фиксаторе, окрашивают разведенной синькой или разведенным фуксином.

Опсоно - фагоцитарная реакция. В цитратную венозную кровь обследуемого больного и неиммунного (не болел и не прививался от данного заболевания) вносят взвесь убитых бактерий, например, бруцелл при бруцеллезе. Пробирки помещают в термостат на 2 часа при 37°С. Образуются 3 фракции: слой эритроцитов (нижний), слой лейкоцитов (средний тонкий слой) и сыворотка крови. Готовят препараты мазки из слоя лейкоцитов. Фиксируют смесью Никифорова, окрашивают синькой Мансона 30 сек.

- *фагоцитарный показатель (ФП)* - процент фагоцитирующих клеток – число лейкоцитов с поглощенными микробами из 100 наблюдаемых. У здоровых людей % составляет 40-80%,

- ф*агоцитарное число (ФЧ)* – среднее количество поглощенных одним лейкоцитом микробов. Подсчитывают количество поглощенных бактерий 25-ю лейкоцитами. Частное количества поглощенных бактерий на 25 называется фагоцитарным числом. Подсчитывают ФЧ больного и неиммунного. ФЧ здорового человека составляет от 1 до 5.

- *опсонический индекс* – это отношение ФЧ иммунной сыворотки (больного) к ФЧ не иммунной. Усиление фагоцитоза в присутствии иммунной сыворотки является результатом воздействия антител — опсонинов и тропинов — на бактерий, отчего последние становятся более доступными фагоцитозу. ОИ больше 1, говорит о слабом иммунном ответе. Чем больше ОИ, тем не благоприятнее течение и исход заболевания.

Известен ряд инфекций — гонорея, туберкулез, проказа, лейшманиоз, при которых фагоцитарный процесс не завершается фазой внутриклеточного переваривания поглощенных микробов,— наоборот, они находят в клетке-фагоците все условия для своего размножения. В таких случаях фагоцитировавшая клетка оказывается переполненной массой размножающихся в ней микробов (например, гонококков). Это явление носит название незавершенного фагоцитоза.

2.3. Лизоцим

Одним из факторов видового иммунитета, губительно действующим на сапрофитную флору, а также на некоторых представителей патогенных микробов, является ферментоподобная субстанция, находящаяся в различных средах организма (плазма крови, перитонеальная жидкость, хрящ), а также в секретах различных желез (слезных, слюнных). При действии лизоцима на различные микроорганизмы наблюдается их лизис. Наиболее чувствительным к лизоциму является Micrococcus lysodeicticus. Лизоцим был впервые открыт П. Н. Лащенковым в белке куриного яйца, который и является одним из источников его получения. Лизоцим получил применение в качестве биологического антисептика как в медицине (особенно в глазной клинике), так и в народном хозяйстве (как консервант некоторых продуктов).

Сила лизоцима определяется его титром — наибольшим его разведением, вызывающим лизис культуры Micrococcus lysodeicticus. Для выявления силы действия лизоцима на различные виды микроорганизмов можно поставить следующий опыт.

Опыт действия лизоцима на различные виды микробов

В 5 пробирок наливают по 0,9 мл 0,5% физиологического раствора, после чего в первую пробирку добавляют 0,1 мл лизоцима и готовят десятикратные разведения путем переноса из предыдущей пробирки в последующую по 0,1 мл до разведения 1: 10000 (четвертая пробирка). Пятая пробирка, контрольная, не содержит лизоцима. Во все пробирки вносят по 0,5 мл стандартизованной одномиллиардной взвеси Micrococcus lysodeicticus, E. coli или другого микроба, содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37° на 3 часа, после чего учитывают результаты и отмечают наибольшее разведение лизоцима, вызвавшее лизис данного микроба.

Для приготовления 1 млрд. взвеси микробов Micrococcus lysodeicticus берут односуточную культуру бактерий на косом агаре и смывают 0,5% физ. раствором . Для смыва в пробирку с ростом микробов стерильно добавляют пипеткой 1—1,5 мл 0,5% физ. раствора . Вращением пробирки между ладонями достигается смыв культуры. Полученную суспензию стерильно отсасывают в пустую пробирку и стандартизуют по оптическому стандарту, разводя имеющуюся суспензию микробов до 1 млрд. микробных тел в 1 мл 0,5% раствором хлористого натрия.

1.1. Экспериментальное заражение животных

Экспериментальное заражение животных имеет чрезвычайно большое значение в микробиологической практике. Оно служит для разных целей:

1) для установления микробиологического диагноза в тех случаях, когда возбудитель, например, фильтрующийся вирус, не может быть обнаружен другими способами, а только воспроизведением типичного заболевания у животного;

2) для выделения с целью диагноза чистых культур из исследуемого материала, когда последний сильно загрязнен другими микробами, например, из мокроты, гноя, загнившего трупного материала и т. д.; при введении такого материала восприимчивому животному в его организме происходит прежде всего размножение патогенных микробов, и, таким образом, после гибели животного можно выделить чистую культуру возбудителя заболевания;

3) для определения вирулентности микробов и т. д. Еще более широкое значение имеет метод воспроизведения экспериментальной инфекции для микробиологической исследовательской работы, где при помощи этого метода разрешаются важнейшие вопросы инфекции и иммунитета, специфической профилактики и терапии и т. д.

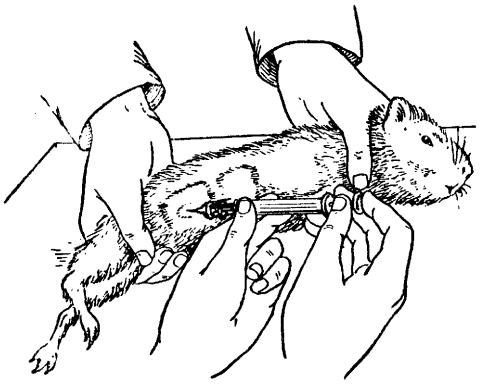


Рис. 52. Подкожное заражение морской свинки.

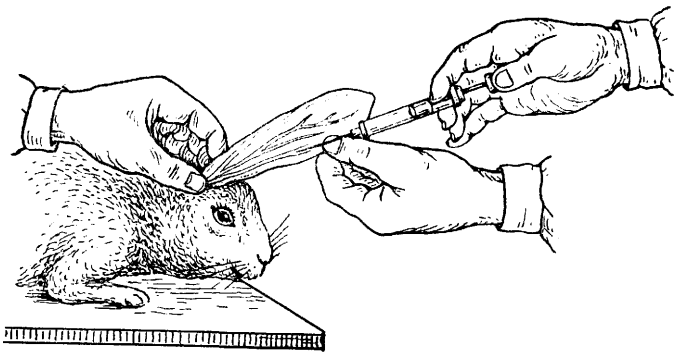


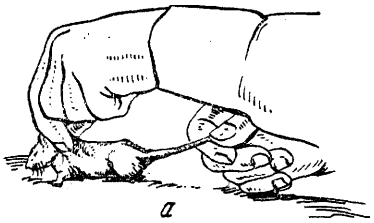
Рис. 53. Внутривенное заражение кролика.

Техника заражения животных

Отбор животных. Для целей эксперимента служат так называемые лабораторные животные: белые мыши, белые крысы, кролики и морские свинки; кошки, собаки, крупные животные, птицы в микробиологической практике используются редко. В опыт берутся животные по возможности одинакового веса и содержащиеся в одинаковых условиях.

Подготовка животного. Перед опытом животных взвешивают (взвешивание повторяют в течение опыта). Иногда для специальных целей в течение нескольких дней до опыта и в ходе опыта производится измерение температуры специальными термометрами через прямую кишку.

Для введения материала необходимо фиксировать животное в спокойном, неподвижном состоянии. Это делается или при помощи специальных приспособлений — различного типа досок, ящиков, держателей, или же животное держит помощник (рис. 52 и 53). При работе с мелкими животными (мыши) фиксирование и введение материала производятся без помощника и без особых приспособлений самим работающим (рис. 54).

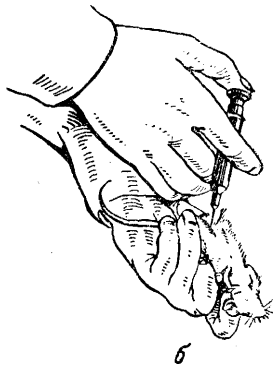


а

Затем следует подготовить место инъекции: выстригают (или выбривают, или выщипывают) шерсть, место инъекции дезинфицируют (спиртом, йодной настойкой).

Подготовка инструментов и материала. Шприцы и иглы стерилизуются кипячением. Материал, нужный для инъекции, помещают в стерильную посуду.

При наполнении шприца опускают отверстие иглы ниже поверхности материала и осторожно и медленно набирают в цилиндр шприца немного большее количество материала, чем требуется. Повернув шприц вертикально иглой вверх, покрывают конец иглы стерильной ватой, выталкивают из шприца пузырьки воздуха, следя за тем, чтобы материал ни в коем случае не разбрызгался; затем вату сбрасывают в дезинфицирующий раствор. После заражения шприц стерилизуется кипячением.



б

Рис. 54. Заражение мыши.

а — первый момент; *б* — второй момент.

Способы заражения животных

Чаще всего пользуются следующими способами заражения.

1. Введение под кожу — наиболее частый способ заражения. Кожу животного захватывают в складку и в нее вводят иглу примерно до половины. Медленно вводят нужное количество материала (0,5—1—2 мл), затем отпускают складку, накладывают на иглу стерильную вату и быстро извлекают иглу. Если введенный материал просачивается наружу, место укола закрывают ватой с коллодием или, что проще, прижигают каким-либо нагретым предметом (например, стеклянной палочкой).

Подкожное заражение применяется с целью вызвать общую инфекцию или для наблюдения локализованных процессов — отек, нагноение и т. д.

2. Внутрикожный метод применяется только со специальными целями (например, для "кожных проб" с токсином). Материал в небольшом объеме (0,1—0,2 мл) вводят тонкой иглой в толщу кожи (желательно пользоваться "туберкулиновым" шприцем с делениями на сотые доли сантиметра). Иглу держат отверстием кверху. Если игла введена правильно, то она видна сквозь эпидермис и на месте инъекции образуется характерный пузырь, похожий на лимонную корочку.

3. Накожный, или кожный, способ заражения представляет собой втирание материала в выбритый участок кожи или в скарифицированную кожу. Втирание производят осторожно (лучше под прикрытием стеклянной воронки) гладкой стеклянной палочкой или шпателем. Животное должно быть фиксировано до тех пор, пока материал совершенно не высохнет. Этим способом пользуются редко, только со специальными целями и только при тех инфекциях, возбудители которых способны проникать через неповрежденную кожу (чумная палочка, спирохеты).

4. Внутримышечное заражение. Кроликам и морским свинкам материал вводят чаще всего в мышцу задней лапы, птицам - в мышцы груди.

5. Внутрибрюшинное заражение. Животное держат головой вниз (внутренние органы перемещаются ближе к диафрагме), чтобы избежать поражения кишечника иглой. С этой же целью пользуются иглой с притупленным концом.

Инъекцию производят в нижней части живота, сбоку от средней линии. Сначала, захватив в складку кожу, прокалывают ее, вводя иглу под острым углом; затем, повернув шприц под прямым углом, толчкообразным движением прокалывают брюшную стенку; при этом ощущается как бы "провал" иглы в брюшину.

6. Инъекции в ток крови (внутривенное) производятся по-разному у различных животных: мышам, крысам и кроликам — в вену, морским свинкам - в вену и внутрисердечным способом.

Внутривенное введение кроликам осуществляется очень легко благодаря поверхностному расположению ушных вен.

Прежде чем приступить к введению материала в вену, кролика следует фиксировать; проще всего это сделать, завернув кролика в полотенце, которое должно плотно прижать к туловищу передние и задние лапы животного. После этого помощник крепко держит кролика одной рукой у себя на коленях или на столе, а другой сжимает ухо у корня, надавив при этом вену, вследствие чего она сильно набухает. Если потереть кожу ксилолом, то вена будет видна еще яснее. Инъекцию лучше производить в наружную вену, так как она плотно лежит в окружающей ткани. После прокола вены иглой сдавливание уха следует прекратить, и тогда жидкость свободно вливается в вену при самом легком надавливании поршня шприца. Если приходится сильно надавливать поршень, это означает, что игла попала не в вену, а под кожу; тогда нужно вынуть иглу и произвести новый прокол вены ближе к корню уха. Окончив введение материала, прижимают, вену в месте укола стерильной ватой, извлекают иглу и тотчас же зажимают этой ватой место инъекции, чтобы не было кровотечения.

Внутривенное заражение белых мышей и крыс производят через хвостовую вену.

Для заражения морских свинок в ток крови пользуются введением в яремную или, что довольно трудно, в бедренную вену. Иногда приходится прибегать к внутрисердечному введению материала, так как у морских свинок поверхностно лежащие вены не видны. Все эти способы сложны и требуют большого опыта.

Для введения в яремную вену или в сердце животное надо привязать животом вверх за четыре лапки на специальном станке или доске; помощник удерживает животное в неподвижном состоянии, положив ему на живот руку. Для впрыскивания в яремную вену ее предварительно отсепаровывают. Материал вводят тонкой иглой; затем на кожу накладывают швы.

При внутрисердечном заражении нащупывают толчок сердца на 1—2 см выше мечевидного отростка и чуть влево от грудины. Вкалывают иглу в “толчок” сердца через межреберный промежуток. Если игла введена правильно, то в шприце показывается кровь, и тогда осторожно вводят заразный материал в объеме не более 1,5—2 мл.

Введение заразного материала в ток крови дает наиболее короткий инкубационный период и быстрое течение инфекции.

7. Заражение через пищеварительный тракт производят или путем примешивания заразного материала к корму, или путем введения его животному в рот или непосредственно в желудок через бонд. Последний способ наиболее точный.

8. Введение через нос. Проводят под легким наркозом, инфекционный материал глубоко проникает в легкие.

9. Внутримозговое введение. Мелким животным материал вводят туберкулиновым шпицом с тонкой иглой, с ограниченной металлической муфтой, на глубину 1,5-2 мм в количестве 0,01-0,02 мл. Укол делают на уровне средней трети линии, соединяющей внутренний угол глаза с основанием уха. Материал вводят медленно, чтобы не вызвать резкого увеличения внутричерепного давления.

1.4. Бактериологическое исследование трупа

Бактериологическое исследование трупа имеет большое, иногда решающее диагностическое значение. Оно позволяет установить причину заболевания, если она не была выяснена в течение болезни, или же подтверждает диагноз, установленный при жизни больного. При экспериментальной инфекции бактериологическое исследование трупа зараженного животного выявляет результат эксперимента.

Целью бактериологического исследования является обнаружение и определение места локализации возбудителя инфекционного заболевания в трупном материале. Трупный материал исследуют бактериоскопически — микроскопией мазков и бактериологически — путем посевов. Для получения исследуемого материала производят вскрытие трупа.

Вскрытие трупа. При вскрытии заразного трупа необходимо соблюдать определенные условия.

1. Вскрытие трупа и его бактериологическое исследование производят возможно скорее после смерти. До вскрытия труп должен сохраняться на холоду.

2. Вскрытие трупа, взятие материала и исследование его производят в условиях, предохраняющих от загрязнения посторонними микробами.

3. Извлеченный материал не должен соприкасаться до момента посева с дезинфицирующими средствами.

4. Все трупные материалы после использования должны обеззараживаться; трупы животных, а иногда и людей (например, при чуме) сжигаются.

5. Все наблюдения во время вскрытия, а также результаты исследования протоколируются.

6. При вскрытии заразного трупа и исследовании материала из него абсолютно необходимо предупредить всякую возможность заражения как самих работающих, так и других лиц, а также и окружающей обстановки.

Подготовка погибшего животного к вскрытию производится следующим образом: животное захватывают пинцетом, кладут брюшком вверх на деревянную доску, помещенную

в эмалированную или оцинкованную кювету, и прикрепляют к доске за четыре лапки, широко раздвинув их. Производят осмотр трупа и отмечают внешние патологические изменения, если таковые имеются. На некоторое время покрывают труп ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, чтобы при вскрытии не разлеталась шерсть, содержащая микробов, и были умерщвлены насекомые (эктопаразиты животных). Перед самым вскрытием тщательно протирают кожу дезинфицирующим раствором или спиртом или обжигают шерсть пламенем горелки.

Вскрытие и исследование трупа животного распадаются на три этапа:

1) вскрытие и исследование наружных покровов;
2) вскрытие и исследование грудной полости;
3) вскрытие и исследование брюшной полости.

Инструменты перед вскрытием переносят из стерилизатора в стакан со спиртом и ватой на дне. Перед употреблением инструменты обжигают на пламени.

1. Вскрытие и исследование наружных покровов. Делают разрез кожи (не повреждая при этом нижележащих тканей) по прямой линии от нижней челюсти до лобка, затем боковые разрезы к лапкам. Отсепаровывают кожу в обе стороны от разреза. Отмечают изменения в подкожной клетчатке: расширение сосудов, кровоизлияния, отек, состояние лимфатических желез и т. д. Если имеется припухание или нагноение желез, делают из них мазки и посевы.

2. Вскрытие и исследование грудной полости. Захватив пинцетом мечевидный отросток, делают под ним надрез и, вставив в него ножницы, перерезают с обеих сторон ребра в местах их соединения с хрящами. Откидывают грудину кверху, производят осмотр открывшейся грудной полости, отмечают наличие или отсутствие жидкости в ней, обращают внимание на внешний вид легких, сердца.

Производят обязательный посев крови из сердца. Для этого прижигают поверхность верхушки сердца раскаленным скальпелем и через прижженный участок вкалывают капилляр стерильной пастеровской пипетки (конец капилляра перед посевом обламывают, проводят его через пламя); выдувают по нескольку капель крови в пробирки с бульоном и агаром. Из оставшейся крови делают мазки.

После посева органы грудной полости осматривают более подробно и все наблюдения заносят в протокол. В случае надобности делают посевы и мазки из ткани легких, плевры, экссудата.

3. Вскрытие и исследование брюшной полости производятся после исследования грудной полости. Приподняв пинцетом брюшную стенку, разрезают ее ножницами от диафрагмы до лобка (при этом ни в коем случае не поранить кишечника!) и образовавшиеся лоскуты отводят в стороны. Если нужно, делают посев из экссудата. Осматривают и отмечают в протоколе состояние органов брюшной полости. Особенно внимательно осматривают печень, селезенку, отмечают их величину, цвет, консистенцию. Вырезав кусочек селезенки, делают посев и мазки. В случае надобности делают посевы и мазки из других органов брюшной полости.

Материал для посевов из органов берут следующим образом: прижигают поверхность органа и на этом месте делают разрез; с поверхности разреза соскабливают петлей ткань и засевают ее на бульон и агар.

Мазки из органов готовят размазыванием по стеклу поверхностью разреза или отпечатками: вырезают из органа небольшой кусочек и, взяв его пинцетом, несколько раз прикасаются поверхностью разреза, как печатью, к предметному стеклу. Отпечатки всех органов делают на одном стекле, соблюдая определенную последовательность их расположения:

1-й ряд – лимфатические узлы,
2-ой - легкое,
3-й- селезенка,
4--й – печень,
5-й - мазок крови.

Фиксируют мазки или обычным способом на пламени, или, если хотят сохранить структуру клеточных элементов органа, в жидком фиксаторе [смесь Никифорова (спирт +

эфир поровну)]—10—15 минут, метиловый спирт—3—5 минут. Окрашивают мазки фуксином (или синькой) и по Граму.

Во время вскрытия нужно тщательно следить за тем, чтобы зараженный материал (кусочки тканей, кровь, жидкость, шерсть животного) не попадал на стол. Категорически запрещается класть прямо на стол употреблявшиеся при вскрытии инструменты. После вскрытия производят тщательную уборку рабочего места. Все инструменты кипятят: доску и кювету протирают тампонами со спиртом и обжигают или заливают на сутки дезинфицирующим раствором; труп животного сжигают или автоклавируют. Посевы тщательно надписывают и помещают в термостат.

Контрольные вопросы к занятию № 7 «Физиологические механизмы естественной резистентности».

1. Понятие видового иммунитета. Влияние внешней среды на видовой иммунитет
2. Классификация видов и форм иммунитета, способы создания
3. Барьерная роль кожных покровов и слизистых.
4. Естественные киллеры.
5. Воспаление, лихорадка, нормальная микрофлора организма.
6. Барьерная роль лимфоузлов, выделительная функция.
7. Биологические механизмы самозащиты на уровне генома клетки.
8. Гуморальные антимикробные факторы.
9. Система макрофагов, функции макрофагов.
10. Этапы фагоцитоза, причина незавершенного фагоцитоза, механизм фагоцитоза
11. Методы изучения фагоцитоза.
12. Опсонизирующие свойства иммунных сывороток.
13. Система интерферонов, биологические свойства интерферона
14. Система комплемента: состав, функции.
15. Техника заражения лабораторных животных.
16. Способы заражения животных
17. Бактериологическое вскрытие трупа.

3. Приобретенный иммунитет. Методы иммунизации. Изучение реакций иммунитета.

3.1. Получение иммунных сывороток

Иммунные сыворотки, применяемые в медицинской практике, содержат антитела к микробам или их токсинам: они готовятся для *лечебных и диагностических целей.*

Лечебные сыворотки применяются для лечения инфекционного заболеваний, так как введение больному большого количества готовых антител приводит к гибели микробов — возбудителей болезни или к обезвреживанию их ядов. Эти сыворотки реже применяются с профилактической целью, так как они сообщают лишь пассивный иммунитет, длящийся короткое время (2—3 недели). Различают антитоксические, антимикробные, антивирусные сыворотки.

Диагностические сыворотки используются для установления лабораторным путем диагноза инфекционного заболевания: при помощи специфических антител распознается выделенный из организма микроб — возбудитель данного заболевания. Диагностические сыворотки (агглютинирующие, преципитирующие, гемолитические, антиглобулиновые) широко применяются в лабораторной практике.

Лечебные и диагностические сыворотки готовятся путем гипериммунизации животных соответствующими антигенами. Для получения больших количеств лечебной сыворотки иммунизируют крупных животных (лошадей); диагностические сыворотки получаются чаще всего путем иммунизации кроликов. Иммунизация проводится путем

подкожных или внутривенных инъекций антигена в возрастающих количествах обычно с интервалами между инъекциями в 5—8 дней; число инъекций зависит от цели иммунизации и характера антигена.

Первым этапом в технике получения иммунных сывороток является приготовление антигенов. *Антигенами* называются чужеродные для организма вещества, которые вызывают в организме образование антител. Последние различным образом воздействуют на микробы или их продукты. Антигеном может быть любое вещество белковой природы — микробы или другие клетки, продукты микробов (например, токсины) и, наконец, другие белковые вещества (например, сыворотка).

По окончании курса иммунизации у животных стерильно берут кровь (у лошадей — путем кровопускания из яремной вены, у кроликов - непосредственно шприцем из сердца) и получают из нее после свертывания сыворотку. С этой целью кровь, собранную в стерильную посуду, сначала помещают в термостат при 37° на 4—6 часов, для ускорения свертывания, затем в ледник на сутки. Полученную прозрачную сыворотку осторожно отсасывают в стерильную посуду, прибавляют к ней для консервирования 0,5% хлороформа или других веществ. Лечебные сыворотки выдерживают на леднике в течение 4—6 месяцев. За это время происходит просветление сыворотки вследствие выпадения нестойких белков, снижаются ее токсические для человека свойства и устанавливается более или менее устойчивый титр антител. Затем сыворотки титруются на содержание антител, проверяются на стерильность и на безвредность для животных и расфасовываются по ампулам. Сыворотки сохраняются на холоду и в темноте; срок годности их считается 1 год; сыворотки помутневшие не допускаются к употреблению.

Наибольшее распространение приобрели *антитоксические лечебные сыворотки* (противодифтерийная, противостолбнячная, противогангренозные и др.), дающие быстрый терапевтический эффект благодаря нейтрализации микробного токсина в организме больного. Антибактериальные сыворотки (противоменингококковая, противострептококковая) оказывают более медленный эффект.

При практическом применении лечебных сывороток больному всегда вводят строго определенные дозы этих сывороток. Для антитоксических сывороток лечебную силу определяют в так называемых антитоксических единицах, обозначаемых АЕ. Единица антитоксина является условной величиной. Так, для дифтерийного антитоксина I АЕ считается то наименьшее количество иммунной сыворотки, которое нейтрализует 100 Dlm дифтерийного токсина для морской свинки весом 250 г.

Иммунизация кролика. Наиболее распространенным способом иммунизации животных является подкожное или внутривенное введение антигена.

Антиген вводят в вену при помощи стерильного шприца с тонкой иглой. Наполнив шприц соответствующим антигеном, необходимо удалить пузырьки воздуха во избежание воздушной эмболии в случае попадания воздуха в вену. Для этого берут шприц вертикально, вверх иглой, (насаживают на конец иглы кусок стерильной ваты) и осторожно проталкивают поршнем поднявшиеся кверху пузырьки воздуха вместе с некоторым количеством жидкости.

Объем вводимой в вену жидкости обычно равен 0,5—1— 1,5 мл. Если антигеном являются бактерии, то делают суспензию по стандарту из суточной культуры бактерий, убивают бактерий нагреванием при 60° в течение часа и вводят в вену 1 мл суспензии. При иммунизации эритроцитами отмывают их физиологическим раствором путем троекратного центрифугирования и отсасывания жидкости над осадком, затем приготовляют 50% взвесь эритроцитов в физиологическом растворе и вводят в вену 0,5 мл этой взвеси. При повторной иммунизации доза антигена увеличивается.

Взятие крови у кролика. Небольшие количества крови у кролика берут из краевой ушной вены. Техника взятия крови из вены подобна технике внутривенных инъекций, отличаясь тем, что здесь берут пустой шприц, в который медленно набирают, вытягивая поршень, свободно поступающую из вены кровь. Если нет необходимости в сохранении стерильности крови, то можно получать ее путем прокола вены иглой шприца, через

которую кровь обильно вытекает в подставленную пробирку. Большие количества крови извлекают непосредственно из сердца стерильным шприцем, после чего кролику вводят подкожно равный объем подогретого до 38° физиологического раствора.

Реакция флокуляции с дифтерийным анатоксином

Сила анатоксина, выражаемая в иммуногенных (антигенных) единицах, определяется реакцией флокуляции с соответствующей антитоксической сывороткой. Было показано, что в пробирке, где количество антитоксических единиц сыворотки соответствует количеству анатоксина и вступает с ним в нейтральное соединение раньше, чем в других, выпадают нежные хлопья (инициальная флокуляция). Количество анатоксина, дающее в смеси с 1 АЕ сыворотки инициальную флокуляцию, называется 1 иммуногенной единицей анатоксина (1 ИЕ).

Постановка реакции. Антитоксическую сыворотку известной силы разливают в уменьшающихся количествах в ряд пробирок, в которые затем добавляют по 2 мл анатоксина и помещают в водяную баню при 45°. Время от времени пробирки просматривают и отмечают ту, в которой раньше всего произошла флокуляция. Зная количество АЕ сыворотки в данной пробирке, легко вычислить и количество иммуногенных единиц анатоксина. Например, если инициальная флокуляция появилась в пробирке, куда было внесено 0,2 мл антитоксической сыворотки силой в 200 АЕ в 1 мл, то расчет производится следующим образом: в 0,2 мл сыворотки содержится 40 АЕ, а так как в пробирке содержится нейтральная смесь (произошла флокуляция), то, следовательно, 2 мл анатоксина содержат 40 ИЕ, а 1 мл — 20 ИЕ.

3.3. Реакция преципитации

Преципитацией называется явление осаждения антигена (преципитиногена) из раствора при воздействии на него иммунной сыворотки, содержащей антитела — преципитины. Иммунная сыворотка, преципитнрующпя определенный вид антигена, приготовляется путем парэнтералыюй иммунизации животного именно этим антигеном.

Внешнее проявление наступившей реакции преципитации выражается в следующем: при осторожном добавлении прозрачного жидкого антигена к иммунной преципитирующей сыворотке на границе обеих жидкостей появляется мутное кольцо выпадающего в осадок (преципитат) антигена, в связи с чем эту реакцию часто называют кольцепреципитацией. Преципитация выражается также и образованием осадка на дне пробирки.

Реакция преципитации характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью и специфичностью. Она позволяет обнаружить минимальнейшие следы белка-антигена (до разведения 1: 100000 и выше), благодаря чему преципитация практически стала важной реакцией в разнообразных областях: в химии, в биологии и т. д.

Чрезвычайно большое значение реакция преципитации имеет в:

- *судебно-медицинской практике* для распознавания видовой принадлежности крови не только в свежем и жидком состоянии, но также и в высушенном, например, в пятнах очень давнего происхождения на одежде. Из кровяного пятна делают вытяжку физиологическим раствором, профильтровывают ее и полученную прозрачную жидкость употребляют в качестве антигена для реакции с преципитирующей сывороткой, приготовленной путем иммунизации кроликов человеческим белком (сывороткой). Положительная реакция преципитации показывает, что в исследуемом пятне содержится человеческая кровь.
- *санитарной практике* реакция преципитации является методом для определения фальсификации мясных, мучных и других продуктов.

- *микробиологической практике* реакция преципитации как метод диагностики инфекционных заболеваний имеет меньшее применение, нежели широко распространенная реакция агглютинации.

Для серологического диагноза пользуются реакцией преципитации в тех случаях, когда антиген может быть получен только в жидком состоянии, например, в вытяжке из инфицированных органов, в спинномозговой жидкости, в моче больного и т. д.

Реакция преципитации может ставиться как с веществами белковой природы - полноценными антигенами, так и с гаптенами — неполноценными антигенами {полисахариды, липоиды), которые сами по себе неспособны вызывать образование антител, но способны вступать в соединение с последними.

Большое значение реакция преципитации приобрела для распознавания сибирской язвы (реакция Асколи). Она нашла применение при постановке диагноза дифтерийной инфекции (реакция Илика). Большое удобство в практике представляет характерная особенность ряда бактерийных антигенов — преципитогенов: их высокая резистентность к высокой температуре (до 100°). На этом основана реакция термопреципитации по Асколи для диагноза сибирской язвы; антиген извлекают из исследуемого материала (кусочки органов, кожа, шерсть) с помощью кипячения; при этом свойства антигена полностью сохраняются и в тех случаях, когда исследуемый материал подвергся гниению.

Реакция кольцепреципитации

Для постановки реакции преципитации необходимо иметь:

1) преципитирующую сыворотку, приготовленную путем иммунизации кроликов соответствующим антигеном;

2) исследуемый антиген в виде отцентрифугированного или профильтрованного прозрачного раствора (экстракт из микробных тел, из патологических субстратов от больного, из органов, из кровяных пятен, сывороточные белки и т. д.).

Перед постановкой реакции делают разведение антигена (физиологическим раствором) не менее чем 1 : 1000;

3) физиологический раствор (для разведения сыворотки и антигена);

4) специальные узкие (не шире 0,75 см) пробирки с конусообразным дном из очень прозрачного стекла;

5) пастеровские пипетки.

Обязательным условием является полная прозрачность участвующих в реакции ингредиентов — сыворотки и антигена; в противном случае результаты реакции будут неясны.

- в пробирку наливают 0,5 мл преципитирующей сыворотки;
- затем при помощи пастеровской пипетки осторожно наслаивают на сыворотку 0,5 мл антигена;
- пробирку при этом следует держать в наклонном положении, а наслаивание антигена производить осторожным опусканием жидкости по стенке пробирки так" чтобы он не смешивался с сывороткой, а образовал над ней верхний слой; добавив антиген, пробирку осторожно переводят в прямое положение и ставят в штатив. При положительном результате реакции сразу же или в течение 5—10 минут на границе обеих жидкостей образуется мутное кольцо от выпавшего в осадок антигена.

Степень реакции оценивается по величине кольца и времени его появления.

К опыту ставится несколько контролей, а именно:

1) заведомо известный антиген + специфическая преципитирующая сыворотка;

2) преципитирующая сыворотка + физиологический раствор;

3) нормальная сыворотка + исследуемый антиген.

Реакция преципитации в агаре.

Применяется для определения токсигенности дифтерийного микроорганизма. На дно

чашки Петри с питательным агаром укладывают полоску фильтровальной бумаги, размером 1,5Х8, смоченную антитоксином (антитоксической противодифтерийной сывороткой) с 500 АЕ/мл. На поверхность агара засевают в виде бляшек испытуемую культуру и контрольный токсигенный штамм на расстоянии от полоски 0,5 см, расстояние между бляшками – 0,5 см, диаметр бляшки 0,7 см. Учет проводится через 24-48 часов. Токсин из культур диффундирует в агар, где встречается с антитоксином, который диффундирует навстречу. На месте встречи антигена и антител образуется белая полоска преципитата в виде изогнутой линии.

Реакция преципитации с бактериальным гаптеном

Строгая специфичность полисахаридного гаптена, находящегося в протоплазме бактерий, и чувствительность реакции преципитации дали возможность, пользуясь этой реакцией, выявлять наличие данных бактерий в смесях различных микробов, даже если они находятся там в очень небольшом количестве.

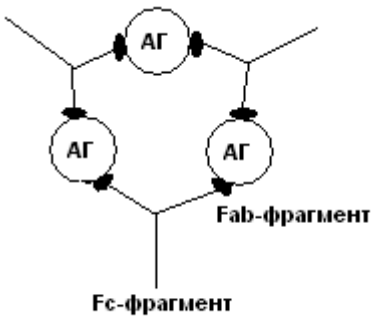
Наибольшее распространение реакция преципитации с гаптеном нашла в диагностике дизентерии.

Техника опыта

1. Делают посев испражнений на чашке с питательной средой (желательны густые посевы), ставят в термостат при 37° на 18—24 часа.
2. Смывают рост 4—5 мл 1% уксусной кислоты, сливают в пробирку.
3. Кипятят на водяной бане 30 минут — 1 час.
4. Фильтруют через асбестовую вату.
5. Прозрачный фильтрат нейтрализуют 20% раствором углекислой соды в присутствии индикатора (спирто - водный раствор розоловой кислоты: 0,1 г розоловой кислоты + 10 мл спирта 4-70 мл дистиллированной воды).
6. Полученный антиген (фильтрат в количестве 0,1—0,2 мл) наслаивают в узких маленьких пробирках на равный объем преципитирующей сыворотки, цельной или разведенной вдвое. На грани между слоем антигена и сыворотки появляется кольцо преципитата.

3.4. Реакция агглютинации

Агглютинацией называется склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток при действием антител в присутствии электролита (изотонический раствор хлорида натрия).



Реакция агглютинации проявляется в том, что в равномерной взвеси клеток, например, бактерий, при добавлении иммунной сыворотки происходит склеивание клеток, образование зернышек или хлопьев, которые постепенно оседают на дно, жидкость же над осадком совершенно просветляется (рис. 57 и 58). Однако зернышки или хлопья образуются

только в том случае, если реакция происходит в присутствии электролитов. Таким образом, для проявления реакции агглютинации нужно иметь:

1) антиген (агглютиноген) в виде взвеси клеток,

2) антитела (агглютинины в виде иммунной сыворотки) и

3) электролиты — обычно физиологический раствор.

Реакция протекает в 2 фазы:

- специфическая, невидимая – происходит образование комплекса антиген плюс антитело;
- и неспецифическая, видимая, протекает в присутствии электролита.

Внешнее проявление положительной реакции агглютинации бактерий имеет двоякий характер в зависимости от свойств антигена:

- у безжгутиковых бактерий, имеющих только один соматический или О - антиген, происходит склеивание непосредственно самих микробных клеток, и образующиеся кучки имеют вид мелких компактных зернышек. Такая агглютинация называется тонкозернистой; она происходит медленно — в течение 18—22 часов.

- у бактерий со жгутиками имеется два антигена — соматический, О - антиген, в самой клетке и жгутиковый, Н-антиген, находящийся в жгутиках. Клетки склеиваются друг с другом жгутиками и образуют рыхлые крупные хлопья. Такая агглютинация называется крупнозернистой; она наступает быстро — в течение 2—4 часов.

Реакция агглютинации, благодаря своей специфичности, простоте постановки получила широкое распространение в микробиологической практике для диагноза многих инфекционных заболеваний: брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, сыпного тифа, бруцеллеза и т. д. Ею пользуются с диагностической целью в двух направлениях.

1. Для определения выделенного из какого-либо субстрата неизвестного микроба. В этом случае агглютинацию ставят с определенной, заранее приготовленной агглютинирующей сывороткой, полученной путем иммунизации кроликов определенным видом бактерий и, следовательно, содержащей агглютинины в отношении этих бактерий.

В качестве антигена берут культуру неизвестного исследуемого микроба; положительный результат реакции указывает, что неизвестный микроб идентичен тому, который был взят в качестве антигена для приготовления агглютинирующей сыворотки.

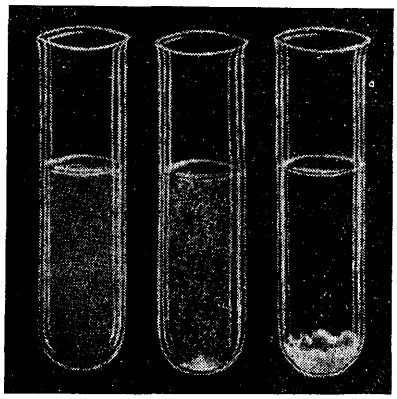


Рис. 57. Реакция агглютинации при наблюдении невооруженным глазом.

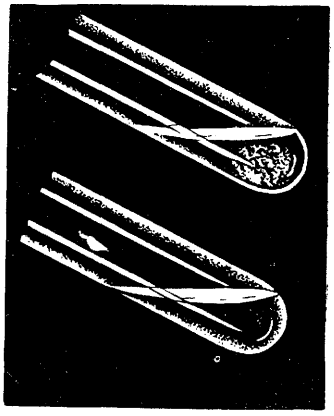


Рис. 58. Реакция агглютинации при наблюдении в лупу.

2. Для обнаружения агглютининов к тому или другому определенному виду бактерий в сыворотке больного. В этом случае для агглютинации берут диагностикум (взвесь известного антигена в известной концентрации, приготовленного промышленным путем).

Эта реакция носит наименование реакции Видаля и широко применяется для диагноза брюшного тифа. Аналогичная реакция агглютинации для постановки диагноза сыпного тифа

называется реакцией Вейль - Феликса, для диагноза бруцеллеза — реакцией Райта.

Постановка реакции

Существует несколько методов постановки реакции агглютинации:
1) развернутая агглютинация в пробирках, которая учитывается через 2 часа выдерживания при 37° и на следующий день стояния при комнатной температуре;
2) ориентировочная агглютинация на предметном стекле в капле концентрированной агглютинирующей сыворотки, наступающая в течение нескольких минут;

Агглютинирующая диагностическая сыворотка готовится путем иммунизации кроликов; полученную иммунную сыворотку, определив ее титр (максимальное разведение), разливают по ампулам с добавлением консерванта; следует иметь в виду, что обозначенный на ампуле титр сыворотки со временем снижается. Иногда употребляют высушенную сыворотку; при пользовании сухими сыворотками разводят их дистиллированной водой 1: 9 из расчета, что сыворотка потеряла при высушивании 9 частей веса.

Сыворотка от больного для постановки реакции агглютинации получается из его крови, взятой стерильно из локтевой вены в количестве 5—10 мл. Одновременно часть крови употребляют для посева. Если же кровь берут только для постановки реакции, то вполне достаточно 1—2 мл; тогда берут кровь из пальца путем прокола иглой Франка.

Антигеном для реакции агглютинации являются соответствующие культуры бактерий в живом или убитом состоянии. Живыми культурами пользуются тогда, когда агглютинация ставится с целью определения вида бактерий, выделенных из какого-либо субстрата; в таком случае суточную агаровую культуру бактерий смывают 1 - 2 мл физиологического раствора и полученной взвесью бактерий пользуются для реакции.

При постановке же реакции с сывороткой больного принято пользоваться заранее заготовленными диагностикумами - взвесью убитых бактерий.

Приготовление О - и Н-антигенов

Соматический О - антиген бактерий является по своему составу сложным химическим комплексом, специфичность которого определяется глюцидолипоидопептидным компонентом.

Этот антиген устойчив к воздействию температуры, спирта в противоположность жгутиковому Н-антигену. Эта различная устойчивость О- и Н-антигенов к нагреванию и спирту положена в основу приготовления 0-антигена.

Наиболее простым способом приготовления О -антигена является прогревание пробирки со смывом агаровой культуры соответствующего микроорганизма в кипящей водяной бане в течение 1,5—2 часов (по Кауфману достаточно 30 минут).

Для приготовления спиртового О -антигена берут возможно более густую взвесь микробов в физиологическом растворе (смыв агаровой культуры). К определенному объему взвеси маленькими порциями медленно добавляют равный объем абсолютного этилового спирта, причем после добавления каждой его порции пробирку с антигеном встряхивают. После добавления всего объема спирта пробирку помещают в термостат на 12—24 часа, после чего в нее добавляют физиологический раствор в количестве половины объема жидкости, содержащейся в данной пробирке (концентрация спирта—33%). Перед употреблением полученный антиген разводят еще в 6 раз.

Приготовление *жгутикового Н-антигена* основано на том, что обработка подвижных микробов формалином приводит к понижению активности соматического антигена. Для приготовления жгутикового антигена к взвеси агаровой культуры микробов в физиологическом растворе добавляют 0,2% формалина, после чего взвесь выдерживают в термостате при 37° в течение 24 часов.

Развернутая реакция агглютинации

Для постановки реакции нужно иметь:

1) агглютинирующую сыворотку,
2) антиген — культуру бактерий или диагностикум,
3) физиологический раствор,
4) градуированные пипетки в 1—5—10 мл,
5) пастеровские пипетки,
6) агглютинационные пробирки размером 10Х0,8—1 см в малом штативе (при постановке реакций иммунитета употребляемая посуда должна быть тщательно вымыта и высушена, но стерилизация для нее не обязательна).

Реакция агглютинации ставится с разведениями сыворотки, начиная с 1: 50 или 1: 100; в цельной или мало разведенной (1:10, 1: 20) сыворотке могут находиться нормальные антитела, и тогда полученная реакция не будет иметь диагностического значения. Поэтому приготовляют основное разведение сыворотки 1: 50 или 1: 100, а из него дальнейшие разведения: при макроскопической агглютинации не только устанавливают наличие антител, но и определяют их количество, т. е. титруют сыворотку.

Если агглютинация ставится с сывороткой больного, то титр сыворотки, т. е. максимальное количество антител в 1 мл, обычно бывает в пределах 1: 400—1: 1 000. Если же для агглютинации пользуются иммунной агглютинирующей сывороткой кролика, то обычно титр ее высок - до 1:15000—1:20000 и больше.

Разведения сыворотки готовятся или отдельно в больших бактериальных пробирках или же непосредственно в агглютинационных пробирках.

В первом случае заготовляют бактериальные пробирки с надписанными разведениями сыворотки и делают разведения, например, по следующей схеме:

1. Основное разведение сыворотки (первая пробирка): к 9,9 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл сыворотки; получают разведение 1: 100;
2. В ряд пробирок кроме первой вносят по 1,0 мл физиологического раствора;
3. Готовят контроли: контроль антигена (КА) – 1,0 физ. р-ра + антиген (Аг)
   контроль сыворотки (КС) – 1,0 мл сыворотки + 1,0 физ. р-ра;
4. В 1-ю и во 2-ю пробирки вносят по 1,0 мл сыворотки. Получают разведение сыворотки 1:100 и 1:200. Из 2-ой переносят 1,0 мл в 3-ю (1:400), из 3-ей переносят 1,0 в четвертую (1:800) т. д. получают двукратные разведения сыворотки. Из последней 0,5 мл выливаем для сохранения объема реакции.
5. Во все пробирки кроме КС вносят по 1 капле антигена (диагностикума).

№ пробирки	1	2	3	4	5	6 и т. д.
Физиологический раствор (в мл)		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Основное разведение сыворотки 1: 100	1,0	1,0→	1,0→	1,0→	1,0→	1,0→
Полученные разведения сыворотки	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200 и
Диагностикум (Аг)	1к	1к	1к	1к	1к	1к
Результат	+	+	+	+	-	-

Штатив с пробирками помещают в термостат на 2 часа, после чего производится предварительный учет реакции; окончательный учет производится после 18—20-часового стояния пробирок при комнатной температуре.

При положительном результате реакции на дне пробирки образуется осадок из склеившихся бактерий (при О-агглютинации в виде “зонтика”), жидкость в пробирке в большей или меньшей степени просветляется. При осторожном встряхивании пробирки осадок превращается в хлопья (крупнохлопчатая Н-агглютинация) или в мелкозернистую взвесь (тонкозернистая О-агглютинация). Результат реакции считается безупречным только в том случае, если взвесь микробов в контрольной пробирке сохраняет первоначальный гомогенный вид.

Учет результатов ведется или невооруженным глазом, или при помощи лупы, или агглютиноскопа. В первых двух случаях каждую пробирку рассматривают на фоне темного экрана или заслоняют ее от прямого света рукой, что хуже. Наиболее точен учет реакции в агглютиноскопе. Реакцию учитывают с контролей и последнего разведения сыворотки.

Положительная реакция учитывается на 2 креста и выше.
++++ (#) полная агглютинация; жидкость прозрачна; очень большой осадок;
+++ жидкость не вполне прозрачна; сильно выраженный осадок;
++ жидкость непрозрачна; выраженный осадок;
+ жидкость непрозрачна; очень небольшой осадок;
+ сомнительная реакция;
- отрицательная реакция; взвесь равномерно мутна; отсутствие осадка.

Ориентировочная агглютинация

Ориентировочную реакцию агглютинации ставят на предметном стекле следующим образом: наносят пастеровской пипеткой каплю сыворотки в разведении 1 : 10, 1 : 20, рядом— каплю физиологического раствора для контроля; затем в каждой капле тщательно размешивают небольшое количество культуры до получения гомогенной взвеси бактерий. Через несколько минут в капле с сывороткой появляется заметное окучивание бактерий, которое еще ускорится, если слегка покачивать стекло; контрольная капля останется равномерно мутной (рис. 59).

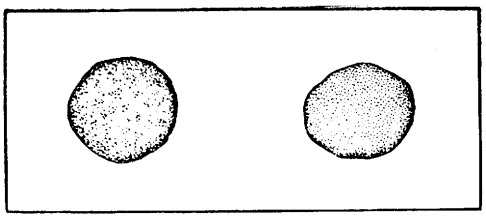


Рис. 59. Агглютинация на стекле.

Ориентировочной агглютинацией чаще всего пользуются для определения микроба, выделенного в чистой культуре на чашках Петри (в колониях). Для агглютинации можно использовать колонию, из которой предварительно сделан посев на косой агар, для постановки развернутой агглютинации на следующий день; таким образом ориентировочно можно ускорить постановку диагноза, который подтверждается на следующий день агглютинацией в пробирках.

Микроскопическая агглютинация

Используют при диагностике холеры – реакция иммобилизации холерных вибрионов. На покровное стекло наносят каплю соответствующего разведения (1:20, 1:40, 1:80) испытуемой сыворотки и добавляют к ней каплю микробной взвеси (при этом сыворотка разводится вдвое), все смешивают запаянным капилляром пастеровской пипетки и накрывают предметным стеклом с лункой, по краям смазанной вазелином, плотно прижимая его. Затем предметное стекло осторожно перевертывают (следить, чтобы капля свободно свисала в углубление) и рассматривают висячую каплю под микроскопом с сильной сухой системой при затемненном поле зрения (с суженной диафрагмой): бактерии, вначале распределенные по всему полю зрения, начинают собираться в кучки и склеиваться. Подвижные бактерии при этом теряют свою подвижность.

Можно произвести такое же наблюдение и в раздавленной капле.

Ошибки при постановки РА.

1. Спонтанная (самопроизвольная агглютинация). Некоторые микробы, особенно в R- форме не дают равномерной взвеси. А быстро выпадают в осадок. Следует пользоваться культурой в S- форме.
2. Агглютинация с «нормальными антителами», которые имеются в организме здоровых людей, в невысоком титре. Специфическая реакция идет в титре 1:100 и выше.
3. Групповая реакция с близкими по антигенному строению микробами например агглютинация сыворотки больного брюшным тифом с тифозными и паратифозными А и В бактериями. Для исключения пользуются адсорбированными сыворотками.
4. Для исключения наличия «амнестических» антител у переболевших, реакцию ставят в динамике, т.е. исследуют сыворотку больного в первые дни болезни и через 5-7 дней.

Повышение титра антител говорит о настоящем заболевании. Титр «амнестических» антител не повышается.

Метод адсорбции агглютининов по Кастеллани

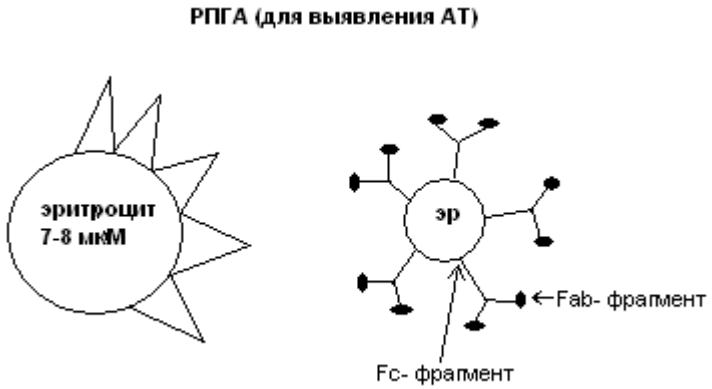
При постановке реакции агглютинации иногда наблюдается явление групповой агглютинации, когда сыворотка больного (а иногда и агглютинирующая диагностическая сыворотка) агглютинирует не один вид микроба, а несколько видов, родственных один другому. Так, например, сыворотка больного брюшным тифом может агглютинировать не только брюшнотифозных бактерий, но и паратифозных А и В; диагностическая дизентерийная сыворотка агглютинирует несколько видов дизентерийных бактерий. То же явление может встретиться и при определении вида исследуемого микроба путем агглютинации, когда обнаруживается, что он агглютинируется не одной специфической сывороткой, но и другими сыворотками близких типов.

В этих случаях, благодаря наличию идентичных компонентов в сложных бактериальных антигенах, в иммунной сыворотке могут оказаться не только антитела к специфическому микробу, но и групповые антитела к родственным видам микробов. Это явление, затрудняющее точную серодиагностику и идентификацию микроба, может быть устранено методом адсорбции агглютининов, предложенным Кастеллани.

Метод: после иммунизации кролика (антигенами А, В, С) добавляют к полученной иммунной сыворотке (антитела А, В, С) неспецифические антигены (Д,В,С), которые способен связать только побочные (групповые) антитела (В и С) , оставляя свободными антитела (А) к специфическому антигену.

3.5 Реакция непрямой (пассивной) гемааглютинации

Антиген адсорбируют на инертных монодисперсных частицах или клетках, например, на эритроцитах, получают эритроцитарный диагностикум. Нагруженные антигеном эритроциты склеиваются под действием специфических антител.



Постановка реакции:

1. ставят в лунках полистероловых пластин;

2. разводят исследуемую сыворотку больного методом серийных двукратных разведений от 1:100 до 1: 6400. Во все лунки ряда, кроме первой вносят по 0,5 мл физ. р-ра. В первую и во вторую (1:200) лунки вносят 0,5 мл сыворотки разведенной 1:100. Из второй в третью после перемешивания вносят 0,5 мл (1:400), из третьей в четвертую 0,5 и т.д. В каждое разведение добавляют 0,25 мл эритроцитарного диагностикума. Учет через 2,5-3 часа.

Положительная реакция: образование «зонтика» на дне лунки – эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток с зазубренным краем, отрицательная – образование «пуговки» или «колечка». Титр сыворотки – последнее её разведение, в которой еще есть реакция агглютинации. Учет проводится на 2 креста: ++.

3. контроли: а) положительная контрольная сыворотка + диагностикум. Реакция положительная.

б) физ. раствор + диагностикум. Реакция отрицательная.

Постановка реакции непрямой агглютинации

№ пробирки	1	2	3	4	5	6 и т. д.
Физиологический раствор (в мл)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Основное разведение сыворотки 1: 100	1,0	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→
Полученные разведения сыворотки	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200 и
Эритроцитарный диагностикум (Аг)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Результат	++++	++++	++++	++	-	-

На эритроцитах можно адсорбировать не только антигены, но и антитела. Применяют для индикации патогенных микробов или их токсинов из материала внешней среды.

3.6. Реакция ко - агглютинации

Белок А клеточной стенки золотистого стафилококка способен адсорбировать на своей поверхности Fc- фрагменты иммуноглобулинов G и M. Активные центры иммуноглобулинов остаются свободными и могут взаимодействовать со специфическими детерминантами антигена. Образуется конгломерат из склеившихся частиц белков А посредством антиген + антитело.

Методика постановки. На предметное стекло наносят каплю взвеси стафилококков сенсибилизированных соответствующими антителами. Вносят капл. Взвеси исследуемых бактерий, перемешивают. Учет через 30-60 сек, происходит четкая реакция агглютинации.

3.7. Реакция латекс – агглютинации

Выполняется микрометодом в лунках на стекле. К исследуемому материалу добавляют латекс-препарат, сенсибилизированный специфическими антителами. Тщательно перемешивают, учет через 10 минут. Все ингредиенты ЛАГ, включая контроли (положительный, отрицательный, контроль латекс - суспензии несенсибилизированных по ЛАГ с исследуемым материалом) входят в состав тест- системы.

3.8. Реакция агрегат-гемагглютинации (РАГА)

Позволяет обнаружить в крови больного как свободно циркулирующие антигены, так и антигены связанные с антителами (циркулирующие иммунные комплексы- ЦИК). Для РАГА используют эритроциты сенсибилизированные соответствующими антителами. Добавление сыворотки больного, в которой содержаться антигены к сенсибилизированным антителами эритроцитам, приводят к склеиванию (агглютинации) эритроцитов и ммунных комплексов.

Классификация серологических реакций по механизму протекания,

технике постановки и природе антигена

- р. агглютинации;
- р. преципитации;
- р. лизиса (с участием комплемента или фагоцитов);
- р. нейтрализации;
- р. иммунофлуоресценции;
- р. иммуносорбентные;

Методы иммуноиндикации антигенов в реакциях иммунитета

I.Реакции непосредственного связывания меченных АТ известной специфичности с местами локализации Аг на м/о. Варианты метки Ат:

- флуоресцентная. РИФ (МФА - метод флуоресцирующих АТ) прямая и непрямая (метод Кунса).
- ферментная. ИФА- иммуноферментный анализ.
- радионуклеотидная. РИА - радиоиммунный анализ.

II. Реакции, протекающие с изменением свойств Аг после взаимодействия со специфическими АТ: склеивание, выпадение в осадок из коллоидного раствора, утрата токсичности, подвижности. Различают АТ:

Агглютинины - вызывают агрегацию клеток. Реакция агглютинации и её разновидности (РНГА).

Лизины – разрушение клеточных мембран; РСК

Преципитины – образуют осадок с растворимыми Аг. Реакция преципитации. Аг-прозрачный коллоидный раствор из патологического материала, объектов окружающей среды или культур.

Антитоксины – нейтрализующие токсины**.** Реакция нейтрализации in vivo.

Реакция торможения гемагглютинации- для типирования вирусов набором типоспецифических сывороток. Учет – по отсутствию гемагглютинации.

Контрольные вопросы к занятию № 8. «Антигены, антитела. Реакции иммунной сыворотки. Реакция агглютинации, преципитации, их разновидности. Серологические методы исследования. Методы иммуноиндикации. Вакцины».

1. Приобретенный иммунитет, разновидности.
2. Понятие об антигене. Свойства антигенов.
3. Классификация антигенов: полноценные, неполноценные, гаптены, полугаптены.
4. Протективные антигены, перекрестно-реагирующие антигены, суперантигены.
5. Химическая природа антигенов.
6. Антигеное строение микробной клетки.
7. Антитела, свойства АТ.
8. Структура молекулы иммуноглобулина.
9. Макромолекулярная структура разных классов иммуноглобулинов.
10. Функции Fc- фрагмента.
11. Валентность АТ.
12. Динамика образования антител. Первичный и вторичный иммунный ответ.
13. Функции Ig M и Ig G.
14. Получение иммунных сывороток.
15. Реакция агглютинации, механизм, постановка.
16. Приготовление О - и Н-антигенов.
17. Ориентировочная агглютинация, реакция иммобилизации.
18. Развернутая реакция агглютинации.
19. Адсорбция агглютининов по Кастеллани.
20. Реакция преципитации, значение реакция преципитации.
21. Реакция кольцепреципитации, Реакция преципитации в агаре.

22. Реакция пассивной гемагглютинации, постановка, механизм.
23. Реакция ко-агглютинации, латекс – агглютинации, РАГА.
24. Вакцины. Методы введения.
25. Живые вакцины. Получение аттенуированых живых вакцин.
26. Вакцины: убитые, химические, анатоксины, искусственные, генно- инженерные, кассетные.

3.9. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод основан на использовании двух разных по специфичести моноклональных антител против двух разных антигенных эпитопов в составе одного искомого антигена. Метод может быть использован для диагностики практически любого заболевания. Можно определять как антигены, так и антитела. Методика постановки включает в себя три этапа.

Обнаружение антигена.
I этап. Адсорбция специфических антител на твердой фазе (лунки полистироловых панелей). Активные центры остаются свободными. Адсорбция готовится промышленным путем;
II этап. Внесение суспензии исследуемого материала с искомым антигеном и связывание его за счет реакции антиген + антитело.
- промывание лунок раствором для вымывания неспецифически связанных с антителами компонентов.
III этап. Внесение специфических антител против данного антигена, меченных ферментом пероксидазой. Меченые антитела связываются с комплексом антиген + антитело.
- промывание лунок раствором для удаления неспецифических компонентов
- внесение субстрата – ортофенилендиамин (ОФД). Пероксидаза расщепляет субстрат, продукты реакции имеют желтую окраску. Реакцию останавливают H_2O_2. Если комплекс не образуется, меченные ферментом антитела вымываются, субстрат не разлагается, содержимое лунки остается бесцветным.

Обнаружение антител.
I этап. Адсорбция специфических антигенов на стенках лунки полистиролового планшета (готовится промышленным путем).
II этап. Внесение исследуемой сыворотки с искомыми антителами к данному антигену. Образуется комплек антиген + антитело.
- промывание лунок раствором для вымывания неспецифически связанных с антигеном компонентов сыворотки.
III этап. Внесение специфических антиглобулиновых антител (антитела против человеческих иммуноглобулинов), меченных ферментом пероксидазой. Образуется комплекс антиген + антитело + антиглобулиновое антитело меченое ферментом.
- промывание лунок раствором для удаления не связавшихся компонентов
- - внесение субстрата – ортофенилендиамин (ОФД). Пероксидаза расщепляет субстрат, продукты реакции имеют желтую окраску. Реакцию останавливают H_2O_2. При отсутствии комплекса, антиглобулиновые антитела вымываются, субстрат не разлагается. Содержимое лунки остается бесцветным.

3.10. Иммунофлуоресцентный анализ (метод флуоресцирующих антител (МФА), люминесцентно- серологический метод (ЛСМ))

К антителам химической связью прикрепляют флуоресцентный краситель

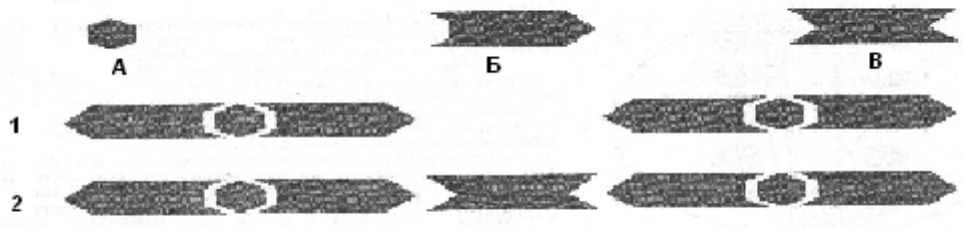
(флюорохром). Краситель активируется светом ультрафиолетовой части спектра (синий светофильтр). Сами испускают лучи другой волны. МФА относят к методам экспресс - диагностики бактериальных, вирусных инфекций.

Прямой метод. Мазок исследуемого материала или выделенной культуры на стекле фиксируют (смесью Никифорова 10 минут или на пламени горелки), обрабатывают люминесцирующей специфической сывороткой 15 минут (например, противочумной). Мазок промывают. Микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Видны светящиеся по контуру зеленым цветом микробные клетки из-за приклеившихся к ним антител. Посторонние бактерии не светятся. Недостаток метода – нужно иметь широкий спектр флуоресцирующих специфических сывороток против каждого антигена (дорого, срок годности ограничен – 1год);

Непрямой метод. Мазок обрабатывается специфической кроличьей сывороткой в течение 15 минут (например, противочумной). А затем - универсальной флуоресцирующей антиглобулиновой (против кроличьих глобулинов) сывороткой также на 15 минут. Антиглобулиновую сыворотку получают иммунизацией барана кроличьими глобулинами. На образующийся комплекс антиген+ антитело фиксируются флуоресцирующие антитела. Видно изумрудно-зеленое свечение бактериальных клеток по контуру. Преимущество: используется только одна люминесцирующая сыворотка для определения различных микробов.

3.11. Реакция Кумбса для выявления неполных антител

При помощи реакций агглютинации определяют полные антитела, т.е. антитела с двумя и более активными центрами. Полные антитела можно определить не ранее начала второй недели заболевания. Неполные антитела появляются раньше – на 3 - 4 день заболевания, но они является моновалентными, т.е. имеют только один развитый активный центр. Они присоединяются к антигену, блокируют его действие, но не вызывают склеивания антигенов в крупные конгломераты - видимой реакции не происходит. Для выявления неполных антител используют антиглобулиновую реакцию Кумбса.



А - антигген; Б - неполное антитело;
В - антитело против моновалентного антитела (антиглобулин).
1 - Соединение неполных антител с антигенами (агглютинации не происходит).
2 - Добавление антиглобулиновой сыворотки приводит к агглютинации антигенов, блокированных неполными антителами.

Компоненты реакции:
- сыворотка больного с искомыми неполными антителами;
- антиген – диагностикум;
- антиглобулиновая сыворотка (АГС) – содержит антитела к человеческому иммуноглобулину. Получают иммунизацией кролика человеческими глобулинами.

Постановка реакции:
1.взаимодействие антигена с неполными антителами.
2. взаимодействие антиглобулиновой сыворотки (АГС) с антителами, адсорбированными на

антигене. Т.к. антиглобулиновые антитела двухвалентны, они связывают два одновалентных антитела, адсорбированных на двух антигенах, что приводит к склеиванию антигенов между собой – агглютинации.

3.12. Реакции лизиса

Реакции лизиса – растворение микробных или других клеток под действием лизина (антител) в присутствии комплемента. Компоненты реакции:

1. Антиген – клетки, эритроциты;
2. Антитело – лизины – иммунная сыворотка. Различают:
   - бактериолитическую сыворотку – содержит антитела, лизирующие бактерии;
   - гемолитическую сыворотку (гемолизины) – лизирует эритроциты;
   - спирохетолизины – лизируют спирохеты;
   - итолизины – лизируют клетки.
3. Комплемент. Используют сыворотку морских свинок. Свежий комплемент нестоек, легко разрушается при нагревании, встряхивании, хранении. Используют сухой комплемент, который разбавляют в физиологическом растворе до объема, указанного на этикетке.
4. Физиологический раствор.

Разновидности реакции лизиса

1. Реакция гемагглютинации – эритроциты агглютинируются при взаимодействии с соответствующими антителами (гемагглютининами). Реакцию используют при определения группы крови.

Гемолитическая сыворотка + эритроциты барана → гемааглютинация (склеивание) эритроцитов

Гемолитическую сыворотку получают из крови животных, иммунизированных чужеродными эритроцитами.

2. Реакция гемолиза.
Для определения титра гемолитической сыворотки и проводят реакцию гемолиза для подготовки и титрования РСК:
- АГ – взвесь отмытых эритроцитов барана;
- АТ – гемолитическая сыворотка против эритроцитов барана;
- комплемент;
- изотонический раствор.

Результат реакции гемолиза – полный лизис эритроцитов в присутствии комплемента - содержимое пробирки станет прозрачным, без осадка – «лаковая кровь».

3.Реакция бактериолиза. Проводят in vitro и in vivo.

in vivo - Смешивают испытуемую культуру с сывороткой и вводят внутрибрюшинно морской свинке. Через 1-2 часа отбирают перитониальную жидкость и изучают морфологию возбудителя.

in vitro – бактерии (антиген) смешивают с гомологичной сывороткой (антитела) и добавляют комплемент. Инкубируют 2 часа в термостате. Делают высев на чашку Петри с питательным агаром, чтобы узнать, лизирован ли микроорганизм. В положительном случае должно быть отсутствие роста.

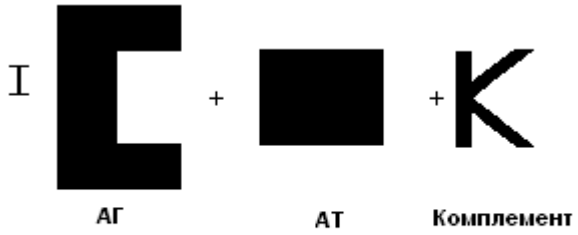
Реакция связывания комплемента (РСК)

Это многокомпонентная двухступенчатая реакция, состоящая из двух систем.

1-ая – антиген + антитело + комплемент. Это основная система.

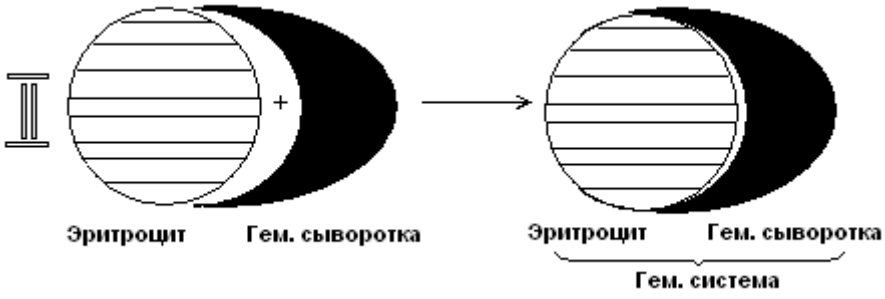
2-ая – эритроциты + гемолитическая сыворотка. Используется 3% взвесь эритроцитов барана в физиологическом растворе. Гемолитическая сыворотка (гемолизины) готовят на производстве. Вторая система носит название гемолитической. Является индикаторной, т.к. по ней судят о полученном результате РСК. Во второй системе нет комплемента и эритроциты всегда соответствуют антителам сыворотки. Реакции гемолиза не происходит из-за отсутствия третьего компонента (комплемента).

I система: АГ + АТ + К (комплемент) → образуется мелкодисперсный комплекс (не виден);



Инкубация 1 час 37°С. В реакцию добавляют 2-ю систему.

II система: Э(эритроциты) + гемолитическая сыворотка. Смесь предварительно выдерживают в термостате 30 минут.



Если в I системе АГ соответствует АТ, происходит их взаимодействие. Меняется конфигурация Fc- фрагмента антитела и к нему присоединяется комплемент. Вторая система остается без комплемента, гемолиза эритроцитов не происходит. Учет реакции: РСК (+), гемолиз (-). Образуется осадок эритроцитов

Если в I системе АГ не соответствует АТ, комплекс не образуется, комплемент уходит во вторую систему, а там всегда есть соответствие, наступает гемолиз. Учет реакции: РСК (-),

гемолиз (+). Содержимое пробирки прозрачное, осадка нет - «лаковая кровь».

Титрование компонентов реакции.

АГ – доза антигена, которая не вызывает задержки гемолиза. В опыт берут ½ титра АГ. Титр антигена указан на этикетке: 0,4 мл разводят до 1,0 мл (0,96 мл) физ. раствором. Берут в опыт 0,5 мл.

АТ – сыворотка больного. Инактивируют для разрушения собственного комплемента (для чистоты реакции). Прогревают 30 минут при 56°С. В опыт берут сыворотку разведенную 1:5.

Комплемент – титр - минимальное количество, которое в присутствии рабочей дозы гемолитической сыворотки обеспечивает полное растворение эритроцитов (гемолиз) в течение 1 часа при 37°С.

Последовательность реакции: физ. раствор + комплемент + гемолитическая система.

в объеме 1,5 мл	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	Физ. р-р
	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	комплемент
мл	1,0	1,01	1,0	1,0	1,0	1,0	1,01	1,0	Гемолитическая система
	Гемолиз -	Гемолиз -	Гемолиз +	Гемолиз +	Гемолиз +	Гемолиз +	Гемолиз +	Гемолиз +	

Рабочая доза комплемента: следующая за титром доза → 0,3.

Гемолитическая сыворотка – разводят в 3 раза меньше, чем указано в титре.

Эритроциты барана – 3% взвесь отмытых эритроцитов.

При правильно поставленной реакции в 1-й пробирке гемолиза не будет. В контролях гемолиза не будет.
Учет по 4-х крестовой системе:
1. ++++ - эритроциты образуют равномерную муть или оседают на дно, жидкость бесцветна. РСК#;

2. +++ - осадок меньше, жидкость розовая. РСК +;

3. ++ - осадок небольшой, жидкость розовая, РСК +

4. + - незначительный осадок, интенсивно окрашенная жидкость. РСК (-);

5. - - жидкость интенсивно окрашена, осадка нет – гемолиз. РСК (-).

Схема постановки РСК

Пробирки / ингредиенты в мл	1 опыт	2 контроль антигена	3 контроль сыворотки	4 гемолитическая система
Сыворотка больного в разведении 1:5	0,5		0,5	
Антиген в рабочей дозе	0,5	0,5		
Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	
Физиологический раствор		0,5	0,5	
Гемолитическая сыворотка в тройном титре				20,0
3% взвесь эритроцитов барана				20,0
	Инкубируют пробирки в течение 1 часа 37°С			
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	
	Инкубируют пробирки в течение 1 часа 37°С			
учет	Гемолиза нет (положительный результат)	Гемолиз	гемолиз	Гемолиза нет (нет комплемента)

Ошибки при постановке РСК.

1. а) недостаток рабочей дозы комплемента: (-) реакция будет выглядеть как (+);
   б) при избытке комплемента: (+) реакция выглядит как (-);
2. антитела (АТ) в избытке: (-) реакция выглядит как (+);
3. недостаток гемолитической сыворотки: (-) реакция выглядит как (+).

Реакцию РСК ставят с разведениями сыворотки больного для определения титра антител. Рекомендуется ставить методом парных сывороток для наблюдения динамики антител.

3.13. Реакции иммунитета in vivo (кожные пробы)

При накожном (на скарифицированную кожу) или внутрикожном введении антигена можно выявить как иммунное состоянии, так и состояние повышенной чувствительности к данному препарату.

Кожная проба с токсином. Внутрикожно вводят оттитрованное количество токсина. В иммунном организме (есть определенный уровень антитоксических антител) произойдет реакция нейтрализации токсина антитоксином – действия токсина не будет. В неиммунном организме на месте введения токсина разовьется воспалительный инфильтрат (припухлость, покраснение, уплотнение). Примеры: проба Дика при скарлатине, проба Шика при дифтерии.

Кожная проба с аллергеном. Проводится для определения реакции гиперчувствительности замедленного типа при ряде инфекций. На аллерген происходит реакция сенсибилизированных Т- лимфоцитов. На месте введения препарата образуется покраснение, припухлость, образование инфильтрата. Примеры: реакция Манту при туберкулезе, реакция Бюрне при бруцеллезе, аллергическая проба с тулярином при туляремии, проба с антраксином при сибирской язве. У не иммунного организма аллергическая проба будет отрицательной.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Принцип - естественная репликация ДНК, которая включает в себя:
- расплетение двойной спирали ДНК;
- расхождение нитей ДНК;
- комплементарное достраивание обеих нитей в определенных стартовых блоках;

1. Специфический участок ДНК маркируют стартовыми блоками (короткий двунитевый участок). Синтез ДНК идет только в этом участке. Происходит увеличение копий специфического фрагмента.
2. Для создания стартовых блоков используют олигонуклеиновые затравки - п р а й м е р ы. Они комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента. Синтез протекает только между ними – удвоение копий фрагмента.
3. Достраивание нитей протекает только в направлении от 5' конца к 3' концу ДНК и происходит в противоположных друг другу направлениях.

Образовавшиеся продукты синтеза служат матрицей для 2-го цикла и т. д. Идет цепная реакция.

Термическая денатурация образовавшихся двухниточных копий ДНК и внесение праймеров повторяют многократно до получения достаточного количества изучаемой ДНК.

Температура синтеза ДНК 72°, время 1-2 минуты.

Температура «отжига праймеров» - 50-60°.

Построение новых нитей ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов осуществляется с помощью фермента ДНК- полимеразы.

За 30-40 циклов амплификации происходит синтез 10^{8} копий фрагмента. Визуальный учет или после электрофореза в агарозном геле и просмотре в УФ-лучах. Видны светящиеся полоски. Или после компьютерной обработки флуоресцентной детекции.

Используют прибор амплификатор с многоуровневым режимом смены температуры.

Чувствительность системы 10-1000 микробных клеток.

Время 2-3 часа.

Исследуется непосредственно клинический материал. Успешная диагностика вирусных латентных и персистирующих инфекций

Контрольные вопросы к занятию № 9 «Реакции с участием комплемента. Реакция ИФА, ПЦР, Кумбса, МФА»

1.Реакции иммунного лизиса: понятие, разновидности, компоненты реакции.
2. Реакции гемагглютинации и гемолиза.
3. Реакция бактериолиза. Варианты постановки in vivo, in vitro.
4. Реакция связывания комплемента, компоненты, механизм, постановка.
5. Схема постановки РСК.
6. Комплемент – строение, функции.
7. Альтернативный путь и путь С1- шунта активации комплимента.
8. Классический путь активации комплимента.
9. Иммуноферментный анализ, механизм реакции обнаружение антител.
10. Иммуноферментный анализ, механизм реакции обнаружение антигена.
11.Реакция ПЦР, механизм.
12. Метод флуоресцирующих антител, прямой и непрямой методы.
13. Реакция Кумбса для выявления неполных антител.
14. Трансплантационный иммунитет.
15. Иммунологическая толерантность, особенности, способы получения
16. Гиперчувствительность немедленного типа. ГНТ I типа.
17. Механизм и фазы анафилактического шока
18. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ).
19. Аллергический метод диагностики (кожные пробы).
20. Полимеразная цепная реакция.

IV. ВИРУСОЛОГИЯ

1.1. Вирусы

В группу вирусов, или “фильтрующихся вирусов”, объединены микроорганизмы, невидимые под микроскопом, ввиду их малых размеров, лежащих за пределами видимости (менее 0,2 мкм) в оптическом микроскопе; они способны проходить через поры специальных мелкопористых фильтров, не пропускающих других микробов. Величина их измеряется тысячными долями микрона — миллимикронами (*ммкм)*.

Присутствие невидимых фильтрующихся микроорганизмов определяется способностью фильтрата из исследуемого материала заражать экспериментальных животных.

При обычных микроскопических исследованиях морфология вирусов изучается двумя способами:

1) путем обнаружения особых внутриклеточных “включений”, образование которых отмечается при отдельных вирусных заболеваниях (например, оспа, бешенство);

2) путем обнаружения при некоторых вирусных болезнях так называемых “элементарных телец” — мельчайших образований, являющихся возбудителями болезни (оспа).

Особые внутриклеточные образования — включения — отмечены при многих вирусных инфекциях. Чаще они обнаруживаются при данном заболевании только в определенной ткани, но при некоторых заболеваниях встречаются в разнообразных тканях.

При одних заболеваниях они находятся в протоплазме клеток, при других—внутри ядер, при третьих — и в протоплазме, и в ядре. Величина их весьма разнообразна, колеблясь от 0,25 до 20—30 а. Не менее разнообразна и форма клеточных включений: чаще они круглые или овальные, но встречаются и другие, весьма разнообразные формы: грушевидные, веретенообразные, иногда причудливо неправильных очертаний. Строение включений всегда характерно для определенного возбудителя инфекции, поэтому их обнаружение используется с диагностической целью.

В медицинской практике наибольшее значение имеет обнаружение включений при бешенстве — так называемых телец Негри (рис. 29), находящихся в протоплазме нервных клеток (преимущественно в ткани аммонова рога), и включений при оспе — телец Гуарниери (рис. 32), расположенных внутри эпителиальных клеток.

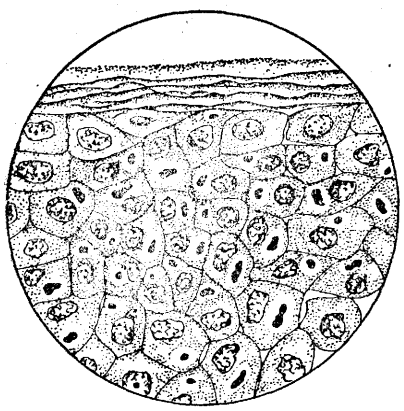


Рис. 31. Тельца Гуарниери (срез из роговицы кролика).

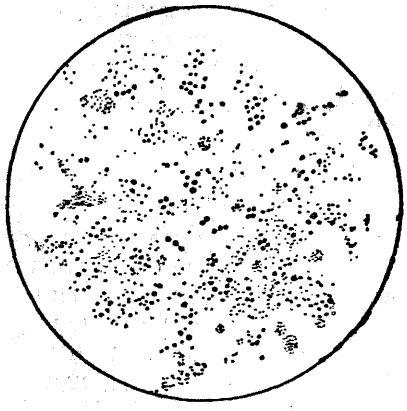


Рис. 32. Элементарные тельца вируса оспы.

Для обнаружения внутриклеточных включений пользуются специальными методами обработки мазков или срезов из тканей

Элементарные тельца с большим постоянством встречаются в содержимом пустул при оспе. При оспе они получили название телец Пашена. Обнаружить их можно при помощи особых способов, в основе которых лежит протрава и импрегнация, приводящая к увеличению размера телец, благодаря чему они становятся видимыми под, микроскопом. Самым лучшим способом является окраска серебрением по Морозову. Даже в увеличенном виде элементарные тельца представляются мельчайшими образованиями размером около 0,2 мкм кокковидной формы, вытягивающимися при делении наподобие гимнастических гирь.

У ряда бактерий (брюшнотифозной, дизентерийной, туберкулезной и др.) обнаружен переход в невидимые (авизуальные) формы, также способные проходить через мелкопористые фильтры.

1.2. Бактериофагия

Бактериофагия (от греческого phagein — пожирать) выражается в лизисе (растворении) живых бактерий под воздействием бактериофага (рис. 50) — особого фильтрующегося агента, природа которого и сущность действия подвергаются многочисленным и разносторонним исследованиям.

Бактериофаги обнаруживаются в воде, в почве, в испражнениях, а также непосредственно в культурах бактерий. Во всех случаях присутствие бактериофагов определяется по их действию на соответствующих бактерий, причем действие это специфично, т. е. каждый бактериофаг наиболее активно действует или на определенный вид бактерий, или на группу родственных видов.

Лизирующее действие бактериофага выражается в полном просветлении бульонной культуры или в образовании на засеянных плотных средах пустых прозрачных участков среди густого налета культуры на поверхности среды (“стерильные” пятна, рис. 51).

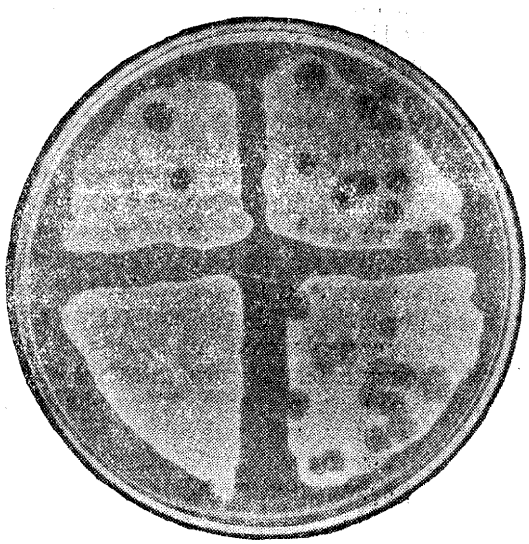


Рис. 51. Явление бактериофагии.

Опыт, демонстрирующий действие бактериофага, можно провести на жидкой среде посевом на бульон, и на твердой среде посевом на агар следующим образом.

1. Делают посев культуры (например, E. coli или Shigella flexneri) в две пробирки с бульоном; в одну из пробирок добавляют петлей бактериофаг; обе пробирки ставят в термостат. Через 18—20 часов в пробирке без добавления бактериофага наблюдается сильное помутнение бульона — произошел рост

Рис. 50. Бактериофаг (электронная микроскопия).

посеянной культуры; бульон в пробирке, куда был добавлен бактериофаг, остается прозрачным, вследствие лизиса культуры под влиянием бактериофага. Этот же опыт можно поставить и таким образом: бактериофаг вносят в опытную пробирку через 3—4 часа роста культуры в термостате, когда отчетливо видны признаки размножения бактерий в виде легкого помутнения бульона.

Пробирки выдерживают в термостате 18—20 часов, после чего в контрольной пробирке наблюдается обильный рост культуры, а в опытной — полное просветление бульона вследствие лизиса культуры бактериофагом.

2. При посеве, на твердые среды действие бактериофага выявляется еще более демонстративно. На двух чашках с агаром делают обильный посев бульонной культуры бактерий (каплю культуры растирают стеклянным шпателем по всей поверхности агара). Затем одновременно с посевом или после выдерживания чашек в термостате в течение 3—4 часов наносят на агар в одной чашке каплю бактериофага и, наклоняя чашку, дают капле несколько растечься по поверхности среды. Чашки выдерживают в термостате в течение суток. По истечении этого срока в контрольной чашке наблюдается обильный сплошной рост культуры, а в чашке с добавлением бактериофага — полная задержка роста в том месте, куда была внесена капля бактериофага.

Там же, где рост культуры произошел, образуются отдельные просветы большей или меньшей величины и более или менее круглой формы — “стерильные пятна”.

На практике бактериофаг применяется:

1) с диагностической целью—фагодиагностика (при дизентерии, холере, брюшном тифе и т. д.) путем:

а) выделения специфического бактериофага из исследуемого материала;

б) воздействия специфического фага на выделенную у больного культуру для определения ее природы;

2) для лечения и профилактики (фаготерапия и фагопрофилактика) инфекционных заболеваний (дизентерия, холера, стафило- и стрептококковые инфекции). Для этой цели производится массовое приготовление фагов, обладающих наибольшей активностью; последняя определяется методом титрования бактериофага.

Приведем краткое изложение обоих методов.

Метод выделения фага из инфекционного (испражнения, гной, кровь, органы, моча, культуры бактерий) или другого материала (вода, почва и т. д.) сводится к следующему. Материал, подлежащий исследованию, засевают на бульон (или пептонную воду) и ставят на сутки в термостат. На следующий день бульон фильтруют. Присутствие фага в фильтрате определяется его лизирующим действием на соответствующую культуру, для чего делают посев суточной культуры в четыре пробирки с жидкой средой (бульон, пептонная вода). Первую пробирку оставляют в качестве контроля культуры, во вторую прибавляют 1 каплю фильтрата, в третью—1 мл, в четвертую—2 мл фильтрата. Пробирки ставят в термостат на 24 часа: за этот срок в контрольной пробирке произойдет явный рост культуры в виде помутнения; в случае присутствия фага в остальных пробирках (в одной, двух или во всех трех — в зависимости от силы фага) обнаруживается просветление среды.

Метод титрования бактериофага

Титрование фага производится на культурах бактерий на жидких и твердых средах.

При титровании на жидких средах приготовляется ряд пробирок с 4,5 мл мясо -

пептонного бульона. В первую пробирку вносят 0,5 мл испытуемого фага. После перемешивания путем переноса из предыдущей пробирки в последующую по 0,5 мл производят разведения фага с уменьшением его концентрации в 10 раз. После этого в пробирки вносят по одной капле суточной культуры соответствующих бактерий. Пробирки с соответствующими пометками разведений помещают на сутки в термостат, после чего определяют титр фага по тому последнему разведению его, которое дало лизис бактерий, т. е. по просветлению бульона в последней пробирке с соответствующей пометкой разведения фага. Титр бактериофага обычно принято обозначать в виде степени десятикратного разведения, например, 10^{-5}, 10^{-8} и т. д.

При титровании на твердых средах поступают следующим образом. Чашки Петри с агаром засевают равномерным сплошным посевом суточной культуры бактерий (количество культуры для посева должно быть одинаковым для всех чашек). Спустя 5—10 минут после посева на каждую чашку наносят равные объемы (капли) соответствующих разведений фага и через 18 часов роста в термостате рассматривают результаты посевов. На чашках с большой концентрацией фага (первые разведения) по следу капли роста культуры нет или имеются отдельные колонии с изъеденными краями или центром. В последующих чашках отмечается большее или меньшее (в зависимости от разведения фага) количество “стерильных” пятен, вплоть до единичных пятен при малой концентрации разведения фага. Положительным результатом считается наличие даже одного стерильного пятна. Титр фага определяется его последним разведением, давшим лизис культуры, т. е. по обнаружению стерильных пятен на последней чашке с соответствующей пометкой разведения фага.

Методы культивирования вирусов

Для выделения вирусов используют:
а) заражение лабораторных животных;
б) заражение куриных эмбрионов;
в) заражение культур тканей.

1.3. Методы заражения животных

Используются белые мыши, морские свинки, хомяки, кролики и др. способ заражения определяется тропизмом вируса к тканям. Заражение в мозг применяется при выделении нейротропных вирусов (бешенство, полиовирусы), интаназальное – при выделении возбудителей нейротропных инфекций. Заболевших животных усыпляют эфиром, вскрывают и производят забор материала из органов и тканей.
Способы заражения:
- внутрибрюшинный;
- внутривенный;
- внутримышечный;
- интраназальный;
- заражение в мозг;

Заражение в мозг. (Метод применяют при работе с нейротропными вирусами). Для заражения используют чаще всего белых мышей. Левой рукой плотно прижимая мышь к столу, большим и указательным пальцами оттягивают кожу головы назад. Туберкулиновым шприцем с предохранительной муфтой на игле прокалывают лобную кость несколько латеральнее средней линии и вводят 0,02-0,03 мл материала. Игла вводиться на глубину 1,5-2,0 мл, при этом отчетливо ощущается “провал” а полость черепа.

При заражении новорожденных мышей (2-3-дневного возраста) их лучше брать руками в перчатках, чтобы после заражения мышата не имели постороннего запаха (пота, дезинфицирующих веществ, антибиотиков и т.д.), так как самка съедает мышат, имеющих посторонний запах. Материал вводят в количестве 0,01 мл, вытекающую жидкость вытирают сухим стерильным ватным тампоном без дезинфицирующих веществ. После заражения мышат помещают в отдельную банку (в свое гнездо), а через 20-30 минут подсаживают к ним самку.

Больных мышат самка так же съедает. Поэтому надо уловить момент извлечения зараженных животных для завершения опыта. Первые 2 дня просматривают мышат 1-2 раза в день, а затем чаще. Через 3-4 дня здоровый мышонок в 2 раза больше зараженного.

1.4. Заражение культур тканей.

Культура ткани - это клетки ткани, выращенные вне организма на специальной питательной среде. Клетки ткани в искусственных условиях сохраняют присущий им обмен и восприимчивость к определенным вирусам. Для культивирования вирусов особенно пригодны клетки с быстрым ростом. Широко применяют эмбриональные ткани (фибробласты куриных эмбрионов, клетки амниона человека и др., а так же культуры тканей опухолей (клетки Hela, Hep-2 и др.)).

Культивирование клеток может производиться в специальных флаконах (колбы-матрацы, флаконы Карреля) и в пробирках. Культура клеток для роста должна иметь опору, например, стенку пробирки.

В выросшую культуру ткани, которая покрывает стенку сосуда в виде однослойного клеточного пласта, засеивают материал, содержащий вирус. Работу производят в стерильных условиях. Для подавления роста микрофлоры вируссодержащий материал предварительно обрабатывают антибиотиками, чаще пенициллином и стрептомицином.

О наличии и размножения вируса в клетках узнают по так называемому цитопатическому эффекту: в результате размножения вируса клетки гибнут и под микроскопом заметны дегенеративные изменения клеток. Пласты зараженных клеток отслаиваются от стенки пробирки или флакона. Так как рост клеток прекращается, pH среды мало изменяется по сравнению с контролем (клетки без вируса).

Питательной средой для культуры ткани могут быть различные растворы, состав которых приближается к составу жидкости организма (синтетическая среда 199, солевой раствор Хенкса с сывороткой, гидролизат лактальбумина с сывороткой и другие). Используются специальные питательные среды, содержащие физиологические количества аминокислот, углеводов, минеральных солей, имеющие pH 7,2-7,4. Наряду с питательными веществами в средах имеется индикатор, изменяющий цвет среды при сдвиге pH от оптимального значения. Среда 199 включает 60 компонентов, среда Игла содержит минимальный набор аминокислот (13) и витаминов (8).

Характеристика культур тканей

По длительности жизни клеточные культуры подразделяются на :

1) однослойные культуры клеток:

- Первично-трипсинизированная культура клеток - взвесь клеток, полученная путем обработки тканей протеолитическими ферментами. Трипсинизацией достигается разделение клеток за счет переваривания межклеточного вещества. Такие клетки, помещенные в питательную среду, растут в виде монослоя и дают однослойную культуру ткани. Первично-трипсинизированная культура ткани выдерживает до 10 пересевов, обладают высокой чувствительностью ко многим вирусам, могут быть получены в большом количестве, безопасны в онкогенном отношении. Недостаток- трудоемкость и длительность получения. Контаминация латентными вирусами. К первичным культурам клеток относятся клетки почек эмбриона человека, макаки резус, эмбриона свиньи, фибробласты куриных эмбрионов.
- Полуперевиваемые культуры клеток – диплоидные клетки одного типа, способные

претерпевать in vitro до 100 пересевов, сохраняя диплоидный набор хромосом. К ним относят фибробласты эмбриона человека. Эти клетки очень требовательны к условиям культивирования.

- Перевиваемые культуры клеток – это однотипные опухолевые или нормальные клеетки человека или животных с измененным кариотипом. Способны к размножению вне организма неопределенно длительное время. Просты для культивирования, используют при лабораторной диагностике вирусных инфекций.

2) Суспензия клеток.

Получение первично - трипсинизированых клеток

Живые клетки для однослойных культур ткани могут быть получены из эмбрионов и органов взрослых животных (чаще из почек) и человека. Для диспергирования ткани используют 0,25-0,3%-ный раствор трипсина, который разрушает межклеточные мостики из соединительной ткани и освобождает клетки.

Метод трипсинизации тканей

Ткань измельчают ножницами (или другим способом) на мелкие кусочки размером 1-3 мм, промывают в буферном растворе Хенкса для удаления крови 2-3 раза, до тех пор, пока жидкость не станет почти прозрачной. Для диспергирования отмытые кусочки ткани обрабатывают раствором трипсина (добавляют 2 объёма трипсина) при температуре 32-37 градусов.

Трипсинизацию проводят в течение нескольких минут (до 10 мин) при постоянном перемешивании пипеткой или в смесителе на электромагнитной мешалке. Суспензию клеток собирают в сосуд, помещенный на лед для прекращения действия фермента. К оставшейся ткани добавляют свежие порции трипсина, т.е. процесс повторяют 6-8 раз. Иногда и более до прекращения помутнения раствора трипсина.

Жидкость, содержащую клетки, фильтруют через марлю для отделения от неё комочков ткани и соединительнотканных волокон, центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 минут, надосадочную жидкость сливают, а клетки отмывают раствором Хенкса. Отмытые клетки добавляют к питательной среде (гидролизат лактальбумина с сывороткой, среда Игла, среда 199 или др.) в разведении 1:200.

В настоящее время имеется много стабильных штаммов клеток, пассируемых вне организма в течение многих лет. Эти культуры клеток называют **перевиваемыми культурами ткани**, или растущими культурами ткани. К ним относятся штаммы клеток, полученные из злокачественных опухолей и нормальных тканей человека и животных:

1) штамм клеток Hela -клетки карциномы шейки матки человека;
2) штамм клеток Нер-2- клетки злокачественной опухоли гортани человека;
3) штамм клеток Детройт-6 - клетки, выделения из косного мозга человека больного ракам лёгких;
4) штаммы клеток А-0 и А-1 - клетки амниона человека;
5) штамм клеток ERK – клетки почек эмбриона кролика;
6) штамм клеток СОЦ – клетки сердца обезьяны Macacus cynomolgus;
7) штамм клеток КВ – клетки карциномы полости рта человека;
8) штамм клеток Vero – клетки почек зеленой мартышки;
9) штамм клеток СПЭВ – клетки почки эмбриона свиньи.

Эти штаммы клеток применяются только для диагностики вирусных заболеваний. Они не могут быть использованы для изготовления вакцинных вирусных препаратов, так как культуры клеток, полученные даже из нормальных тканей в процессе длительных пересевов приобретают характер злокачественного роста.

Техника заражения культуры ткани вирусом осповакцины состоит в следующем. Вирус вакцины разводят синтетической средой 199 в отношении 1:3 и обрабатывают

антибиотиками. Из пробирки с культурой ткани стерильной пастеровской пипеткой отсасывают питательную среду. В пробирку вносят 1 мл разведенного средой вируса вакцины, плотно закрывают резиновой пробкой и помещают в термостат в горизонтальном штативе.

Культивирование вирусов в культурах тканей

Цитопатическое действие (ЦПД) - дегенерация клеток, возникающая в процессе репродукции вирусов в клетках. Вирусы вызывающие ЦПД, называют цитопатогенными.

Микроскопически - различные изменения морфологии клеток:

- образование симпласта – большой многоядерной клетки, образовавшейся в результате многократных незавершенных митозов;
- образование синцития - большой многоядерной клетки, состоящей из клеток, соединенных цитоплазматическими мостиками;
- пикноз ядер;
- пикноз цитоплазматической мембраны;
- вакуолизация;
- полная деструкция клеток;
- некроз;
- круглоклеточная дегенерация – округление клеток с утратой межклеточных связей;
- клеточная пролиферация и образование многослойных клеточных структур;
- очаговая деструкция;
- образование внутриклеточных включений- кристалловидных скоплений вириона;

Макроскопически - слущивание клеток со стенок пробирки.

Характер клеточной дегенерации зависит от вида вируса.

Классификация цитопатического действия (ЦПД) вирусов в культуре ткани

1. Равномерная мелкозернистая деструкция клеток - пикноз ядра и цитоплазматической мембраны, вакуолизация (вирусы Коксаки, ECHO, полиомиелита).
2. Очаговая мелкозернистая дегенерация (вирусы гриппа, клещевого энцефолита и др.).
3. Гроздевидная дегенерация – клетки округляются, увеличиваются, частично сливаются между собой с образованием гроздьевидных скоплений (аденовирусы).
4. Крупнозернистая равномерная деструкция (вирус герпеса).
5. Симпласто- или синцитиеобразование (обезьяньи вирусы, вирусы кори, герпеса, паротита, парагриппа, RC – вирусы).
6. Клеточная пролиферация – у онкогенных вирусов

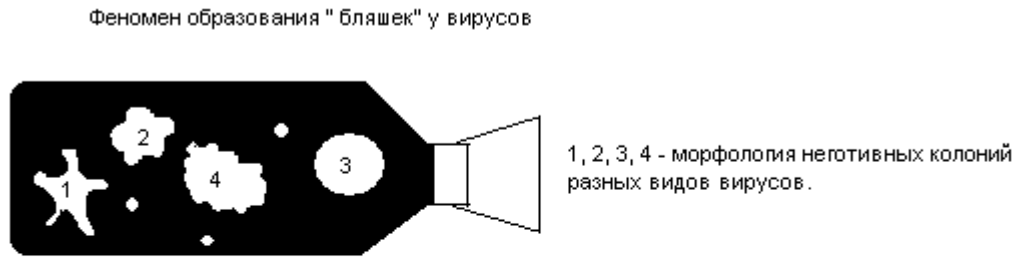
Реакция гемадсорбции (РГадс) – позволяет обнаружить гемагглютинин - содержащие вирусы в клеточных культурах до развития ЦПД. Вирус выставляет свои суперкапсидные белки (гемагглютинин) на цитоплазматической мембране зараженной культуры клеток. после заражения вируссодержащим материалом (V) культуры клеток, в нее вносится 0,5% взвесь эритроцитов и выдерживается 15-20 минут при 37°С, 20°С или 4°С (в зависимости от вируса). Пробирки встряхивают. Отмывают от неадсорбированных эритроцитов. Учитывают под малым увеличением микроскопа. Положительная реакция – скопление эритроцитов на отдельных клетках или на всем монослое. На неинфицированных вирусом клетках адсорбции эритроцитов не наблюдается.

Цветная проба. В процессе размножения и роста клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты обмена веществ, снижающие pH среды. В ткани, зараженной вирусом, наступает дегенерация клеток, подавляется их метаболизм, и не происходит изменение pH среды. Для выявления этих изменений в питательную среду добавляют индикатор феноловый красный (при pH выше 7- цвет индикатора красный, при pH 7- оранжевый, при pH ниже 7- желтый).

Если клетки не заражены вирусом (или он нейтрализован специфической сывороткой), pH питательной среды сдвигается в кислую сторону, среда становится желтой. В случае размножения вируса клетки дегенерируют - среда сохраняет исходный цвет (красный).

Метод бляшек предложен Дюльбекко для получения изолированных колоний вируса. Основа метода - появление в монослое зараженных вирусом клеток обесцвеченных участков, состоящих из дегенерированных клеток - эти участки, получившие название бляшки, представляют собой колонии вируса, образующегося из одной вирусной частицы.

Методика: в специальном флаконе выращивают на стекле монослой клеток, удаляют питательную среду, клетки заражают вирусом, заливают агаром, содержащим индикатор нейтральный красный. При росте и размножении клеток среда изменяется в кислую сторону и индикатор окрасится в розовый цвет, а на тех участках, где клетки погибли под действием вируса, pH среды и цвет индикатора не изменяется. Такие островки неокрашенной среды имеют вид беловатых бляшек.



"Бляшки" (негативные колони вирусов) : ограниченные участки разрушенных вирусами клеток(светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток).
1) " бляшка"- коллония размножившегося одного вибриона. Негативные коллонии разных вирусов отличаются друг от друга. Метод "бляшек" используют: а) для дифференциации вирусов, б) для определения их концентрации.

Метод флуоресцирующих антител (МФА, люминесцентная микроскопия) основан на появлении специфического свечения в местах локализации вируса в клетке при обработке зараженной ткани флуоресцирующими антителами. Препарат с фиксированными инфицированными вирусом клетками подсушивают и фиксируют в ацетоне при 4 ^{o} в течение 10 минут, затем окрашивают специфической флуоресцирующей сывороткой 30 минут при 37 ^{o}C. После окраски препарат промывают физиологическим раствором, высушивают. Просмотр препарата с помощью люминесцентного микроскопа. Комплекс антиген- антитело обнаруживается по свечению.

Методы обнаружения вируса в культуре ткани

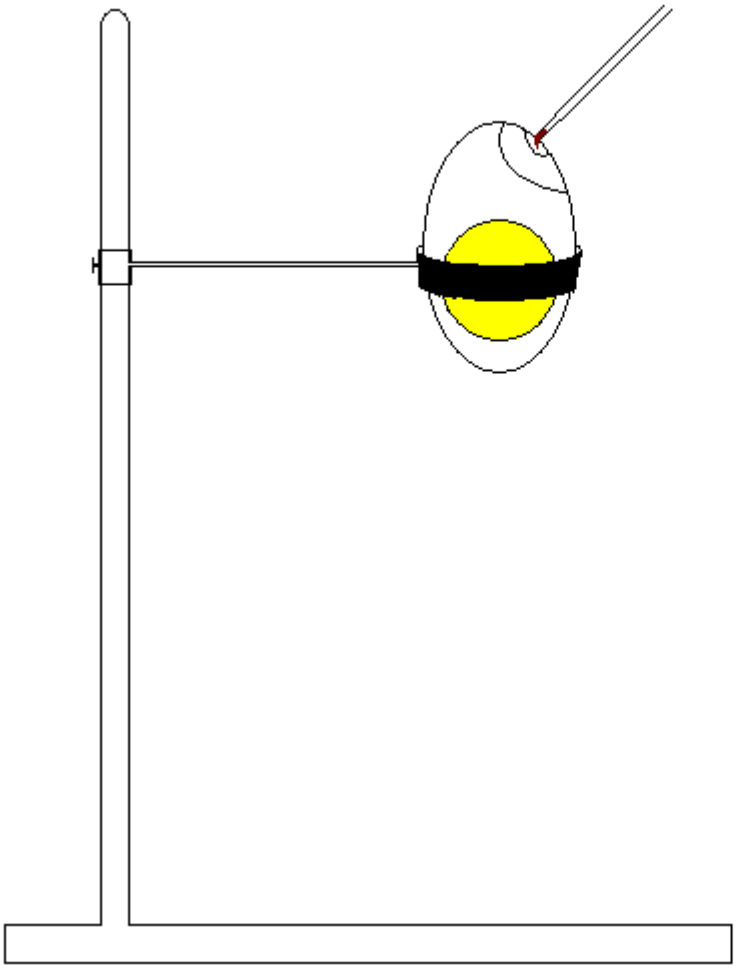
1. Цитопатическое действие (ЦПД);
2. Реакция гемадсорбции;
3. Метод цветных проб;
4. Метод бляшек;
5. Метод флуоресцирующих антител (МФА)
6. Реакция связывания комплемента;
7. Реакция гемагглютинации;
8. Заражение животных, восприимчивых к этому вирусу.

1.5. Методы заражения куриных эмбрионов

- на хорион-аллантоисную оболочку,
- в аллантоисную полость,
- амниотическую полость,
- в желточный мешок.

Для заражения используют эмбрионы 5 - 11-дневного возраста. Перед заражением эмбрионы просматривают в темной комнате при помощи овоскопа для проверки их жизнеспособности (живые эмбрионы подвижны, с хорошо развитыми сосудами) и определения воздушной камеры и места расположения эмбриона. Место на столе покрывают салфеткой, смоченной в растворе хлорамина.

Заражение на хорион-аллантоисную оболочку. Яйцо устанавливают в штативе в вертикальном положении тупым концом вверх, скорлупу, над воздушной камерой обрабатывают спиртом, йодом, повторно спиртом, обжигают, прокалывают стерильными ножницами небольшое отверстие, через которое в полость воздушного мешка вводят одну браншу ножниц и срезают скорлупу над ним. Анатомическим пинцетом захватывают в складку и снимают внутренний листок подскорлуповой оболочки (под ней находится хорионаллантоисная оболочка), на которую пастеровской пипеткой наносят исследуемый материал в количестве 0,2-0,5мл, отверстие скорлупы закрывают стерильным стеклянным колпачком, закрепленным расплавленным парафином, яйцо помещают в термостат при 37^{o} на 48 ч.



Заражение в аллантоисную полость. Подготовительный этап: просматривают куриный эмбрион с помощью овоскопа, отмечают границу воздушной камеры и место расположения эмбриона. Прокалывают скорлупу над воздушной камерой, вводят иглой шприца на глубину 1-1,5 см материал в объеме 0,1-0,2 мл, отверстие закрывают расплавленным парафином.

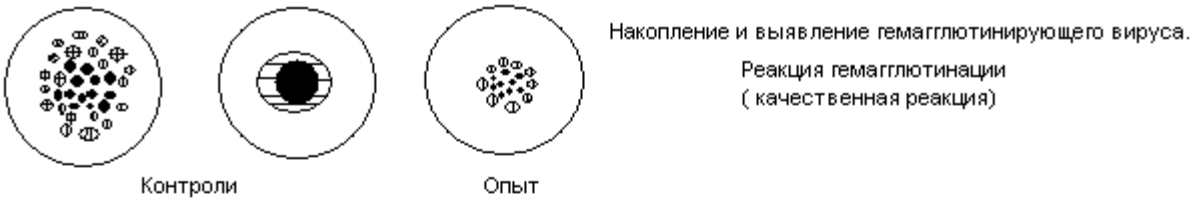
Заражение в амниотическую полость. Удаляют скорлупу над воздушной камерой, бранши пинцета вводят в аллантоисную полость в направлении эмбриона на глубину 2-2,5 см, захватывают амниотическую оболочку, выводят ее из глубины, прокалывают иглой шприца, в амниотическую оболочку вводят материал в количестве 0,1 мл, отверстие закрывают и парафинируют.

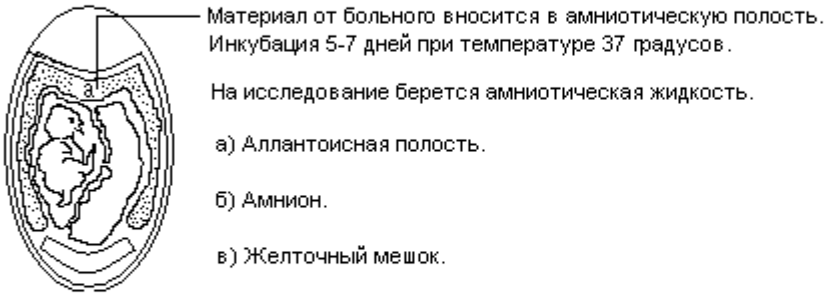
Заражение в желточный мешок (для выделения риккетсий). Исследуемый материал вводят 5-8-дневным эмбрионам длинной иглой через отверстие в скорлупе над воздушной камерой на глубину 2-3 см (при этом надо не повредить зародыш, во время манипуляции он должен находиться ниже желточного мешка, т.е. яйцо укладывают горизонтально).

Вскрытие куриных эмбрионов. После заражения эмбрионы инкубируют в термостате. Располагая тупым концом кверху. Температура и длительность инкубации зависит от свойств вируса. После инкубации эмбрионы охлаждают при + 4°С 16-18 часов. Работу проводят в стерильных условиях. Яйцо ставят воздушным мешком кверху, место вскрытия смазывают спиртом, йодом, спиртом, обжигают, снимают колпачок и ножницами удаляют прилегающую к отверстию часть скорлупы. Пинцетом снимают подскорлупную оболочку, прокалывают пастеровской пипеткой хорион-аллантоисную оболочку и из полости отсасывают аллантоисную жидкость, содержащую вирус. Жидкость помещают в стерильную пробирку. Для исследования хорион-аллантоисной оболочки из яйца удаляют все

содержимое. Оболочку вынимают пинцетом, помещают в чашку Петри, промывают физиологическим раствором, тщательно расправляют и рассматривают на темном фоне изменения (строго специфичны).

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на способности некоторых вирусов, содержащих на своей внешней оболочке агглютинин, склеивать (агглютинировать) эритроциты. Для проведения РГА используют бесклеточный вируссодержащий материал (аллантоисную или амниотическую жидкость, супернатант тканевых культур). Для постановки реакции к капле вируссодержащего материала в лунке планшета добавляют 1 каплю 5%-ной взвеси эритроцитов. Инкубируют при 37°, 20° или 4°С в течение 30-60 минут. Развитие агглютинации в опыте говорит о присутствии вируса в исследуемой жидкости. Контроль – смесь эритроцитов и равного объема раствора хлорида натрия (отрицательный результат).





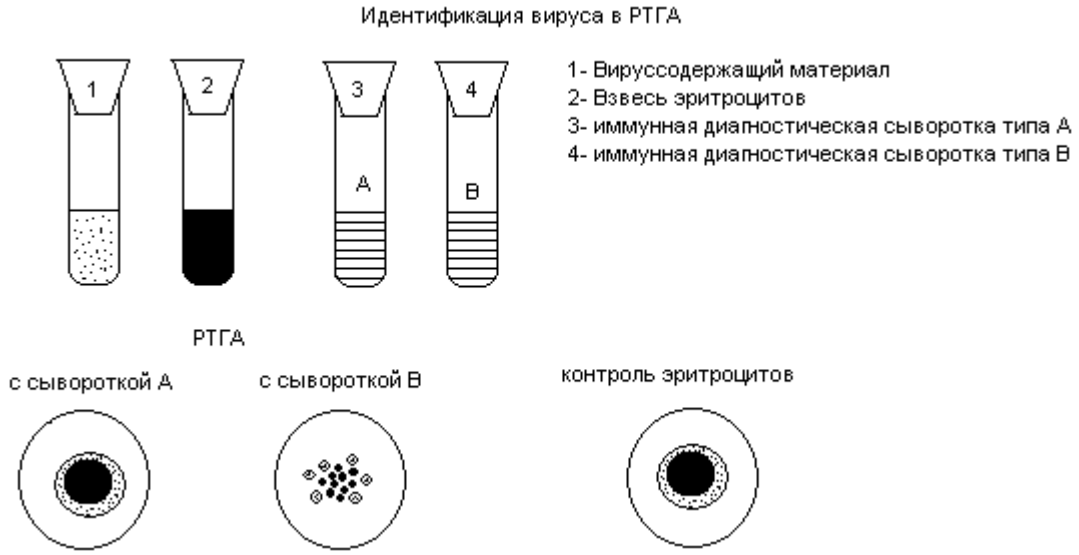
Методы идентификации и определения типа вирусов (типирование вирусов)

Определение типа вирусов в вирусосодержащем материале проводится по принципу: определение неизвестного по известному. Известным компонентов являются специфические противовирусные сыворотки (противокоревые, противополиомиелитные, противогриппозные и т.д.), которые используются в серологических реакциях нейтрализации. Сыворотки содержат специфические противовирусные антитела и называются диагностическими.

Используют серологические реакции:

1. нейтрализация ЦПД;
2. нейтрализация реакции гемадсорбции - РТГадс;
3. нейтрализация цветной пробы;
4. Задержка (торможение) гемагглютинации - РТГА;
5. Свечение клеток, содержащих вирус, под влиянием типоспецифических флуоресцирующих сывороток - МФА;
6. Нейтрализация в опыте на животных;
7. РПГА;
8. РСК;
9. ИФА.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) используется для идентификации вирусов, имеющих поверхностный антиген – гемагглютинин, способный вызывать агглютинацию эритроцитов или типа и титра антител к данному вирусу. Для идентификации вируса или определении его типа в лунки планшета вносят по одной капле вирусосодержащего материала (количество капель должно соответствовать количеству сывороток), вносят по 1-ой капле типовых сывороток (контролем служит физ. раствор и нормальная сыворотка). Смесь выдерживают при комнатной температуре 1 час, после чего в каждую лунку вносят по 1-ой капле 5%-ной взвеси эритроцитов. Смесь инкубируют 30-60 минут при 22°С. . При соответствии вируса типу сыворотки антитела связывают гемагглютинин вируса и гемагглютинация не наступает (РТГА положительна). Напротив, если вирусные гемагглютинины не гомологичны антителам диагностической сыворотки, то вирус не утрачивает способности склеивать эритроциты, наступает гемагглютинация - РТГА отрицательная. Эта реакция может быть поставлена и в пробирках с целью титрования вируса или антител.



Реакция нейтрализации (РН) проводится на культуре клеток, куриных эмбрионах и животных. К вируссодержащему материалу добавляют специфические диагностические сыворотки. Смесь выдерживают 3 часа при 37°С. Происходит нейтрализация вирусных антигенов гомологичными антителами. Нейтрализационные смеси вносят в чувствительную клеточную культуру (куриные эмбрионы, животные), инкубируют 5-7 сут при 37°С. Учитывают реакции по ЦПД и цветной пробе.

РН ЦПД - если антигены вируса нейтрализованы гомологичной диагностической сывороткой, то вирусы инактивируются и не вызывают ЦПД;

РН цветной пробы - если антигены вируса нейтрализованы гомологичной диагностической сывороткой, то вирусы инактивируются и не вызывают гибели культуры клеток. Живые незараженные клетки выделяют кислые метаболиты и вызывают изменение цвета среды с красного на желтый.

Реакция торможения гемадсорбции (РТГадс) используется для идентификации гемадсорбирующих вирусов. Диагностическую сыворотку вносят в пробирки с вирусосодержащим материалом, выдерживают 1 час и добавляют 0,5% взвесь эритроцитов. Инкубируют 20-30 минут. Если гемагглютинины вируса связываются гомологичными антителами, вирус не может адсорбировать эритроциты на поверхности культуры клеток. Выделенный вирус идентифицируется по диагностической сыворотке.

Серологический метод диагностики

Serum (лат) – сыворотка. Материалом для исследования является сыворотка больного. Цель исследования – обнаружение в сыворотке специфических противовирусных антител к известному вирусному антигену (диагностикуму). Используются реакции:

- РТГА;
- РСК;
- РПГА;
- ИФА.

Контрольные вопросы к занятию № 11 «Бактериофаги. Использование бактериофагов. Морфология вирусов. Методы культивирования вирусов».

1. Явление бактериофагии.
2. Строение бактериофага.
3. Этапы взаимодействия бактериофага и клетки.
4. Классификация БФ
5. Виды фаговой инфекции: продуктивная и редуктивная.
6. Ультрамикроскопическая организация вирусов.
7. Химический состав вирионов: вирусная ДНК, РНК, белки, липиды, углеводы.
8. Свойства вирусов.
9. Классификация вирусов.
10. Репликация вирусных геномов: двунитевая ДНК, однонитевая РНК, РНК ретровирусов, ВГВ.
11. Механизм взаимодействия вируса с клеткой.
12. Методы культивирования вирусов.
13. Культуры клеток: первично-трепсинизированные и перевиваемые.
14. Методы культивирования вирусов: заражение куриных эмбрионов.
15. Обнаружение вирусов. Цитопатический эффект.
16. Обнаружение вирусов, Метод цветных проб.
17. Обнаружение вирусов. Метод бляшек.
18. Обнаружение вирусов. Реакция гемадсорбции.
19. Обнаружение вирусов. Реакция гемагглютинации.
13. Методы диагностики вирусных инфекций.

Контрольные вопросы к занятию № 12 «Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ): вирусы гриппа, парагриппа, кори, аденовирусы. БТП для профилактики и лечения».

1. Классификация ОРВИ
2. Строение вируса гриппа А
3. Изменчивость вируса: антигенный шифт и дрейф

4. Препараты для профилактики и лечения гриппа
5. Патогенез и клиника заболевания
6. Характеристика ортомиксовирусов
7. Методы лабораторной диагностики: РТГА, МФА, ПЦР
8. Структура вируса кори, клиника, патогенез заболевания
9. Лабораторная диагностика кори: ИФА, РПГА
10. Препараты для профилактики и лечения коревой инфекции

Контрольные вопросы к занятию № 13 «Острые кишечные вирусные инфекции (ОКВИ): энтеровирусы, ротавирусы, вирусы гепатитов А и Е. БТП для профилактики и лечения».

1. Классификация пикорновирусов
2. Общая характеристика энтеровирусов
3. Вирусологические и эпидемиологические признаки энтеровирусов
4. Морфология полиовирусов
5. Лабораторная диагностика энтеровирусов
6. Профилактика полиомиелита
7. Ротавирусная инфекция, морфология, лабораторная диагностика
8. Не парентеральные вирусные гепатиты: А и Е.

Контрольные вопросы к занятию № 14 « Возбудители параэнтеральных гепатитов: В, С, Д. БТП для профилактики и лечения.

1. Строение вириона вирусного гепатита В
2. Геном ВГВ
3. Клиника, патогенез заболевания
4. Механизм репликации вириона
5. Лабораторная диагностика ВГВ
6. Профилактика ВГВ
7. Дельта – гепатит, строение, особенности
8. Вирусный гепатит С: строение, репликация

Контрольные вопросы к занятию № 15 «Микробиологическая диагностика ВИЧ – инфекции. Герпесвирусные инфекции и их разновидности. БТП для профилактики и лечения»

1. Лабораторная диагностика вируса иммунодефицита.
2. Строение вируса иммунодефицита.
3. Регуляторные и структурные гены вируса.
4. Патогенез, клиника заболевания.
5. Механизм репликации вируса с клеткой.
6. Изменчивость вируса.
7. Перспективы создания противовирусных препаратов для профилактики и лечения.
8. Лабораторная диагностика.
9. Классификация герпесвирусных инфекций.
10. Строение ВПГ.
11. Механизм взаимодействия вируса с клеткой.
12. Лабораторная диагностика ВПГ.

Контрольные вопросы к занятию № 15 «Арбовирусные инфекции»

1. Арбовирусы. Понятие.
2. Альфавирусы. Строение на примере вируса леса Семлике.

3. Альфавирусы. Жизненный цикл вирусов.
4. Флавивирусы. Клещевой весенне - летний энцефалит.
5. Флавивирусы. Японский энцефалит.
6. Флавивирусы. Желтая лихорадка.
7. Флавивирусы. Омская геморрагическая лихорадка.
8. Буньявирусы. Крымско - Конго геморрагическая лихорадка.
9. Аренавирусы. Лихорадка Ласа.
10. ГЛПС.
11. Диагностика арбовирусных инфекций.

Контрольные вопросы к занятию № 16 «Генетика бактерий»

1. Модификации.
2. Мутации: спонтанные, индуцированные, R-S- диссоциации.
3. Генетические рекомбинации. Трансформация.
4. Генетические рекомбинации. Трансдукция.
5. Генетические рекомбинации. Конъюгация.
6. Плазмиды.
7. Функции плазмид.
8. Свойства плазмид.
9. Пути передачи плазмид.
10. Значение плазмид.

Литература:

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: «Медицина» 1982.- 462 с.
2. Борисов Л.Б., Козьмин – Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие. – М.: Медицина, 1993. – 240 с.
3. Королюк А.М., Сбойчаков В.Б. Медицинская микробиология. Часть первая.- СПб, 2002.- 267 с.
4. Королюк А.М., Сбойчаков В.Б. Медицинская вирусология. Часть вторая.- СПб, 2002.- 163 с.
5. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник.- СПб: «Специальная литература», 1998ю – 592с.
6. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998.-1200 с.
7. Райкис Б.Н., Пожарская В.О., Казиев А.Х. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении). Учебное пособие. М.: «Триада-Х2, 2002.-352 с.
8. Тэц В.В. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Медицина, 2002. – 352 с.