



ЛАНЬ®
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
МОСКВА
КРАСНОДАР
2014

**Н. М. КОЛЫЧЕВ,
Р. Г. ГОСМАНОВ**

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ

Допущено Министерством сельского хозяйства РФ
в качестве учебника для студентов
высших аграрных учебных заведений,
обучающихся по специальности
111801.65 — «Ветеринария»



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ • МОСКВА • КРАСНОДАР
2014

ББК 28.4я73

К 61

Колычев Н. М., Госманов Р. Г.

К 61 Ветеринарная микробиология и микология: Учебник. — СПб.: Лань, 2014. — 624 с.: ил. (+ вклейка, 8 с.). — (Учебники для вузов. Специальная литература)

ISBN 978-5-8114-1540-3

Учебник состоит из шести разделов: «Общая микробиология», «Основы учения об инфекции», «Основы иммунологии», «Методы диагностики инфекционных болезней», «Частная микробиология и микология», «Санитарная микробиология».

Включены основные сведения о морфологии, физиологии, генетике и экологии микроорганизмов, инфекции и инфекционном процессе. Рассмотрены виды иммунитета, неспецифические факторы защиты, антигены, антитела, иммунная система организма, иммунологическая толерантность. Содержатся материалы о возбудителях основных инфекционных болезней и их специфической профилактике, о патогенных микробактериях, микроскопических грибах и др. Также уделено внимание микробиологическим исследованиям воды, почвы, воздуха, сырья животного происхождения, пищевых продуктов и кормов для животных.

Учебник разработан в соответствии ФГОС третьего поколения, дополнен новыми теоретическими и практическими данными и предназначен для студентов по направлению подготовки (специальности) — «Ветеринария», квалификация (степень) «специалист».

ББК 28.4я73

Рецензенты:

И. Н. НИКИТИН — доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой организации и экономики ветеринарного дела Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана, заслуженный деятель науки РФ, Чувашской Республики, лауреат Государственной премии Республики Татарстан в области науки; *О. Н. ИЛЬИНСКАЯ* — доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета, академик АН РТ.

Обложка

Е. А. ВЛАСОВА

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

- © Издательство «Лань», 2014
- © Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов, 2014
- © Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2014

ВВЕДЕНИЕ

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология (от *греч.* *micros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение) — наука о мельчайших, не видимых простым глазом организмах — микроорганизмах или микробах.

Микробы представляют собой самостоятельную обширную группу низших, в основном, одноклеточных организмов, генетически связанных с растительным и животным мирами. Для изучения этих организмов, различимых только при увеличении в сотни и тысячи раз, разработаны специальные методы исследования.

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

Своим успешным развитием микробиология обязана прежде всего достижениям физики и химии, позволившим расшифровать некоторые особенности обмена веществ. Благодаря электронной микроскопии изучена тонкая структура бактериальной клетки. Химия дала много новых аналитических методов исследования, что заставило пересмотреть механизмы и сущность энергетического обмена, биосинтеза ряда веществ. В свою очередь, неоценим вклад микробиологии в генетику, биохимию, молекулярную биологию. Использование микроорганизмов в качестве генетических и биохимических объектов открыло новую эпоху в естествознании. С достижениями в микробиологии

связано решение многих теоретических проблем общей биологии и медицины, а также их практического применения. На микроорганизмах впервые была изучена роль ДНК в передаче наследственной информации, доказаны сложная структура гена и взаимосвязь мутационных процессов со структурой ДНК. Изучение жизнедеятельности микроорганизмов выявило их способность (высокую активность) к синтезу весьма ценных соединений, имеющих большое практическое значение.

В зависимости от экологических особенностей микробов, условий их обитания, сложившихся в процессе эволюции различных взаимоотношений микробов и окружающей среды, наконец, в зависимости от практических потребностей человека наука о микробах в своем развитии дифференцировалась на специальные дисциплины.

Общая микробиология изучает общие закономерности строения, развития и жизнедеятельности микроорганизмов, их роль в природе, генетику, а также вопросы систематики и классификации. Она является базовой для всех других отраслевых разделов микробиологии.

Промышленная (техническая) микробиология изучает микроорганизмы, используемые в различных отраслях промышленности с целью получения пищевых продуктов, спирта, ферментов, аминокислот, витаминов, антибиотиков, кормового белка и других биологически активных веществ, а также разрабатывает способы предохранения продуктов и сырья от порчи их микроорганизмами.

Космическая микробиология изучает влияние космических условий на жизнедеятельность микроорганизмов.

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

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

Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни человека, и разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней специальными препаратами (сыворотки, вакцины и др.), а также рассматривает условия сохранения патогенных микробов в окружающей среде, пути и механизмы их распространения.

Ветеринарная микробиология изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни сельскохозяйственных, промысловых и диких животных, птиц, рыб, пчел, а также болезни общие для животных и человека (зооантропонозы). Кроме того, изучается роль микроорганизмов в животноводстве (микрофлора кормов, желудочно-кишечного тракта) и технологиях получения пищевых продуктов животного происхождения.

Ветеринарная микробиология тесно связана с медицинской своими задачами и методами их решений, но применительно к животным. Недаром говорят, что они взаимодополняют друг друга: «медицинский врач лечит человека, а ветеринарный — человечество».

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

В самостоятельные дисциплины из ветеринарной микробиологии выделились иммунология, вирусология, микология.

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

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

Микология (от *греч.* *mykes* — гриб, *logos* — слово) — наука о грибах, начала развиваться во второй половине XVIII в., в настоящее время сформировалась полностью как самостоятельная наука.

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

Главные задачи современной микробиологии:

- углубленное изучение молекулярной организации и метаболизма микроорганизмов, микробиологического синтеза новых ценных продуктов, влияния факторов среды на жизнедеятельность микроорганизмов;
- изыскание специфических средств борьбы с инфекционными болезнями человека, животных и растений.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

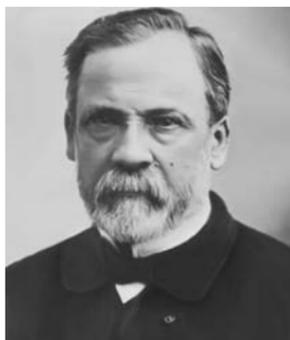
На протяжении тысячелетий человек жил в окружении невидимых существ, бессознательно использовал продукты их жизнедеятельности, основой которых служили процессы молочнокислого, спиртового, уксуснокислого брожений. Страдал от них, когда эти существа были причиной болезни, но не подозревал об их присутствии, так как их размеры много ниже предела видимости человеческого глаза. Предположения о том, что брожение, гниение и заразные (инфекционные) болезни — результат воздействия невидимых существ, были выдвинуты Гиппократом (460–377 гг. до н. э.), Лукрецием (96–55 гг. до н. э.), Вергилием (70–19 гг. до н. э.). Итальян-

ский врач и астроном Д. Фракастро (1478–1553) и немецкий ученый-энциклопедист А. Кирхер (1602–1680) пришли к заключению, что болезни от человека к человеку передаются мельчайшими живыми существами, но доказать этого не могли.

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

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

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



Л. Пастер (1822–1895)

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

В 1865 г. Пастер установил, что порча вина и пива обусловлена попаданием в суло микроорганизмов или диких дрожжей и для предупреждения их размножения предложил нагревать вино и пиво до 100°C. Этот способ получил название «пастеризация».

Историческая справедливость требует отметить, что в XVIII в., еще задолго до Л. Пастера, выдающийся русский ученый М. Тереховский (1740–1796) применял кипячение как метод стерилизации в своих опытах, поставленных с целью решить вопрос о самозарождении. Анализируя условия появления живых организмов в различных настоях, он пришел к выводу, что их образование в средах, подвергнутых кипячению, не происходит. Благодаря этим открытиям возникли антисептика и асептика в хирургии.

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

Занимаясь изучением природы заразных болезней, Пастер открыл возбудителя холеры кур, стафилококки, стрептококки, возбудителя рожи свиней, установил этиологию сибирской язвы. Он обнаружил важное свойство патогенных микроорганизмов — способность к ослаблению вирулентности. На этой основе им была разработана стройная **теория ослабления (аттенуации) вирулентности микроорганизмов**. Пастер успешно использовал ослабленные культуры для прививок против инфекционных болезней. Культуры микроорганизмов с ослабленной

вирулентностью были названы **вакцинами**, а метод прививок — **вакцинацией**. Он предложил методы получения вакцин против холеры кур, сибирской язвы, бешенства. С этого времени в микробиологии наступила **иммунологическая эра**. Основателями иммунологии были И. И. Мечников (1845–1916), Э. Беринг (1854–1917) и П. Эрлих (1854–1915).

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

При изучении сибирской язвы Пастером в результате культивирования сибиреязвенных бацилл при температуре 42,5°C был получен низковирулентный вакцинный штамм.

Вершина деятельности Пастера — исследования по борьбе с бешенством. Многочисленные попытки выделить возбудителя на искусственной среде или хотя бы увидеть его под микроскопом оказались безрезультатными. Поэтому в качестве исходного материала для приготовления вакцины был использован мозг кроликов, зараженных суспензией из мозга собаки, погибшей от бешенства. Путем многократных пассажей через мозг кролика был получен возбудитель со стабильными свойствами (*virus fixe*), который послужил исходным материалом для изготовления антирабических (от *lat. rabies* — бешенство) вакцин. Опыты предохранения собак от заражения бешенством с помощью таких вакцин дали хороший результат. Однако испытать вакцину на человеке Л. Пастер долго не соглашался. Все же он решился вакцинировать ребенка, сильно покусанного бешеной собакой, и тем спас его от неизбежной смерти.

Успех Л. Пастера стал сенсацией. Одной из первых стран, где было налажено производство антирабической вакцины по методу Л. Пастера и прививки для предупреждения бешенства, стала Россия. В июне 1886 г. И. И. Мечников и Н. Ф. Гамалея организовали в Одессе Пастеровскую станцию.

Идеи Л. Пастера и его учеников (Э. Ру, А. Иерсен, Э. Дюкло, Ш. Шамберлан, Г. Рамон, Ж. Борде, А. Кальметт и др.), теоретические и практические результаты их исследований

приобрели всеобщее признание; благодаря их использованию были открыты и изучены возбудители многих заразных болезней, разработаны средства и методы лечения и профилактики.

Человечество высоко чтит выдающиеся заслуги и память Луи Пастера. На средства, собранные по международной подписке, в 1888 г. в Париже был открыт Пастеровский институт, остающийся до настоящего времени крупнейшим центром микробиологических исследований. Имя Л. Пастера присвоено многим научно-исследовательским институтам в различных странах мира и нашей стране.

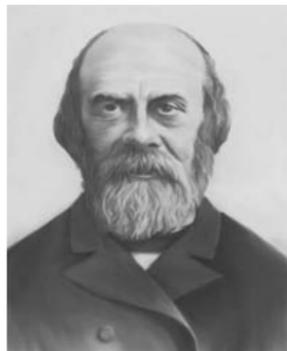
Ценный вклад в новую науку — микробиологию — наряду с Пастером внес немецкий ученый Роберт Кох (1843–1910). Им разработаны методы микробиологических исследований. Впервые в практике лабораторных исследований были предложены плотные питательные среды (мясопептонный желатин и мясопептонный агар), что позволило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



Р. Кох (1843–1910)

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

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



*Л. С. Ценковский
(1822–1887)*

Велика заслуга в развитии микробиологии гениального русского ученого И. И. Мечникова (1845–1916). К числу важнейших достижений в области микробиологии относятся его исследования патогенеза холеры человека, сифилиса, туберкулеза, возвратного тифа. Он является основоположником учения о микробном антагонизме, благодаря которому развилась антибиотикотерапия. На принципе антагонизма им была обоснована теория долголетия и предложено для продления человеческой жизни использовать простоквашу, впоследствии названную мечниковской. В 1886 г. он совместно с Н. Ф. Гамалея организовал первую в России бактериологическую станцию.

И. И. Мечников создал новое направление в микробиологии — иммунологию, это учение о невосприимчивости организма (иммунитете) к инфекционным болезням. Им создана фагоцитарная теория иммунитета, раскрыта сущность воспаления как защитной реакции организма. Немало учеников Мечникова впоследствии стали крупными микробиологами: Н. Ф. Гамалея, А. М. Безредка, Л. А. Тарасевич, Г. Н. Габричевский и др.

Велика роль в становлении микробиологии Н. Ф. Гамалеи (1859–1949). Его научные работы посвящены изучению инфекции и иммунитета, измен-



*И. И. Мечников
(1845–1916)*

чивости бактерий, профилактике сыпного тифа, холеры, туберкулеза и других болезней. Гамалея впервые в 1893 г. наблюдал и описал явление спонтанного лизиса бактерий под влиянием неизвестного в то время агента — бактериофага, принимал активное участие в создании первой бактериологической станции в России и ввел в практику прививку против бешенства.

Г. Н. Габричевский (1860–1907) первым начал читать курс бактериологии в Московском университете. В 1893 г. он опубликовал учебник «Медицинская микробиология», в 1895 г. создал в Москве первый бактериологический институт. С первых дней работы института Г. Н. Габричевский приступил к изготовлению противодифтерийной сыворотки, затем внедрил ее во врачебную практику. Он установил значение гемолитического стрептококка как возбудителя скарлатины, разработал и предложил вакцину, изучил его роль в патологии человека.

Многим обязана микробиология русскому ученому Д. И. Ивановскому (1864–1920), создателю нового направления — вирусологии. В 1892 г. им был открыт возбудитель мозаичной болезни табака, получивший название фильтрующегося вируса.

Основоположник общей и почвенной микробиологии С. Н. Виноградский (1856–1953) разработал накопительные питательные среды, выделил и изучил азотфиксирующие и нитрифицирующие бактерии почвы, установил роль микробов в круговороте азота, углерода, фосфора, железа и серы; впервые доказал существование бактерий, самостоятельно синтезирующих органические вещества, что позволило открыть новый тип питания микробов — аутоτροφизм.



*С. Н. Виноградский
(1856–1953)*

Дальнейшее развитие микробиологии связано с внедрением **молекулярной биологии**, т. е. с **молекулярно-генетическим периодом** (1941–1950). Исследование микроорганизмов открыло новую эпоху не только в генетике, но и в естествознании вообще. Использование генетических методов исследований при изучении биохимии бактерий позволило установить законы наследственности и изменчивости у высших

форм. После определения наследственности и изменчивости бактерий стало возможным говорить о том, что общие закономерности эволюции, открытие Ч. Дарвиным для животных и растений, являются общими и для микроорганизмов. У микроорганизмов был выявлен целый ряд ранее неизвестных механизмов передачи наследственной информации — трансформация, трансдукция, конъюгация и др.

Благодаря развитию молекулярной биологии и генетики в период 1960–1970 гг. появилась такая наука, как биотехнология. **Биотехнологический период** связан прежде всего с открытием антибиотиков в 1940–1950 гг., с созданием крупномасштабных микробиологических предприятий, проведением широкой селекции микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, а также с бурным развитием производства кормовых дрожжей, белково-витаминных концентратов и аминокислот для животных. Немаловажное значение в становлении данного периода сыграли достижения в генетической инженерии, которые коренным образом изменили представление в селекции микроорганизмов — продуцентов вакцин или иных биопрепаратов.

Заметное влияние на развитие ветеринарной микробиологии оказали отечественные микробиологи Е. М. Земмер, И. И. Щукевич, И. М. Садовский, А. В. Дедюлин, А. В. Конев, А. А. Раевский и многие другие. Крупнейшим вкладом в мировую науку послужило почти одновременное изготовление в 1891 г. русскими учеными Х. И. Гельманом и О. И. Кальнингом маллеина для аллергической диагностики сапа.

Большой вклад в развитие ветеринарной микробиологии по изучению патогенеза, разработке диагностики и средств специфической профилактики многих инфекционных болезней животных внесли Г. М. Андреевский, П. Н. Андреев, А. М. Владимиров, С. В. Вышелесский, Д. С. Руженцев, М. Г. Тартаковский и многие другие.

Н. А. Михин (1872–1946) — один из основоположников ветеринарной микробиологии в нашей стране — открыл возбудителя лептоспироза крупного рогатого скота, разработал методику изготовления формол вакцины против сальмонеллеза телят и противоколибактериозной сыворотки, а также методику гипериммунизации лошадей при получении противосибирязвенной сыворотки. Он является автором первого в стране

учебника «Курс частной микробиологии для ветеринарных врачей и студентов».

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

Необходимо отметить, что многие ученые, помимо научных изысканий, непосредственно участвовали в ликвидации эпизоотий, рискуя жизнью, работали в опасных очагах инфекций.

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ
ОБЩАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ

ГЛАВА 1. СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Все живые организмы распределяются в трех сферах обитания: животный мир, растительный мир и мир простейших. На нашей планете насчитывается до 3 000 000 видов животных и около 500 000 видов растений.

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

У **высших протистов** клетки сходны с растительными и животными клетками, это эукариоты, то есть микроорганизмы, имеющие истинное ядро (от *греч.* *eu* — истинный, *karuon* — ядро). Ядро отделено от окружающей его цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной с порами. В ядре находятся 1–2 ядрышка — центры синтеза рибосомальной РНК и хромосомы — основные носители наследственной информации, состоящие из ДНК и белка. При делении хромосомы распределяются между дочерними клетками в результате сложных процессов — митоза и мейоза. Цитоплазма эукариот содержит митохондрии, а у фотосинтезирующих организмов — и хлоропласты. Цитоплазматическая мембрана, окружающая клетку, переходит внутри

цитоплазмы в эндоплазматическую сеть; имеется также мембранная органелла — аппарат Гольджи — как компонент цитоплазмы. К эукариотам отнесены микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых), микроскопические грибы (плесени и дрожжи).

К **низшим** отнесены протисты, клетки которых по строению существенно отличаются от всех других организмов (бактерии и сине-зеленые водоросли), это прокариоты (доядерные). Прокариотические клетки устроены проще. В них нет четкой границы между ядром и цитоплазмой, отсутствует ядерная мембрана; ДНК не образует структур, похожих на хромосомы эукариот, поэтому у прокариот не происходят процессы митоза и мейоза. У большинства прокариот отсутствуют внутриклеточные органеллы, ограниченные мембранами, а также митохондрии и хлоропласты; рибосомы свободно лежат в цитоплазме.

Прокариотические организмы — это сине-зеленые водоросли, бактерии, риккетсии, актиномицеты и микоплазмы.

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

Систематика (от *греч.* *systematicus* — упорядоченный) — наука о классификации организмов, их эволюционном родстве и взаимоотношениях друг с другом.

Классификация (от *лат.* *classis* — разряд, группа) — это распределение множества организмов на основе учета их общих признаков на классы, группы (таксоны); составная часть систематики.

Таксономия (от *греч.* *taxis* — расположение) — теория классификации, систематизации живой природы.

Термины «систематика» и «таксономия» часто употребляются как синонимы, однако систематика — более широкое понятие. Она включает три самостоятельные составные части: классификацию, идентификацию и номенклатуру. Классификация, как уже упоминалось, — это распределение организмов на таксономические группы.

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

Номенклатура представляет собой свод правил присвоения названий таксонам и список этих названий. Это заключительный этап систематики после классификации, выполняет функции «информационного языка» и до некоторой степени независим от классификации.

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

Следовательно, традиционная, или классическая систематика, основанная на изучении внешних, проявляющихся в процессе жизнедеятельности признаков, — целиком фенотипическая систематика (феносистематика). Расширение доступной исследователю информации о фенотипе и использование вычислительной техники для ее обработки привело к появлению нового направления — численной (числовой, или нумерической) таксономии.

Возникновение (в 50-х гг. XX в.) и успешное развитие молекулярной биологии способствовали становлению нового направления в систематике, названного отечественными учеными **геносистематикой**. В отличие от феносистематики, занимающейся изучением множества признаков, она базируется на исследовании только одного вещества — наследственного материала (ДНК) клетки, в котором запрограммировано индивидуальное развитие организма. Иначе говоря, геносистематика — это раздел систематики, предметом исследования которого являются генотипы, или генетические программы, созданные в процессе биологической эволюции на Земле. Разница между феносистематикой и геносистематикой заключается в том, что они принципиально отличаются объектами исследования.

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

В микробиологии, как и в биологии, для обозначения видов бактерий принята двойная (бинарная) номенклатура, предложен-

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

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

В микробиологии используют следующие термины: «чистая и смешанная культура», «клон» и «штамм». Под культурой понимают микроорганизмы, выращенные на плотной или в жидкой питательной среде в условиях лаборатории. Культуру микроорганизмов из особей одного вида называют чистой культурой. Смешанная культура — смесь неоднородных организмов, выросших в питательной среде при посеве исследуемого материала (молока, почвы, воды, патологического материала) или при попадании в питательную среду, засеянную одним

видом микроба, еще и другого вида микроба из внешней среды. Клон — это культура, полученная из одной популяции клетки определенного вида микроба. Штамм — чистая культура определенного вида микроба, выделенная из того или иного объекта и отличающаяся от эталонного штамма незначительными изменениями свойств (например, чувствительностью к антибиотикам, ферментацией углеводов и др.).

В микробиологии существуют два различных подхода к систематике, обуславливающие два вида классификации. В основе первого лежит идея создания естественной (филогенетической) классификации прокариот, то есть построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами микробов и историю их эволюционного развития. Второй подход преследует практические цели и служит для идентификации, то есть установления принадлежности микроорганизма к определенному виду. Это искусственная классификация (традиционная). Современные системы классификации микроорганизмов по сути все искусственные. На их основе созданы определители для идентификации того или иного микроорганизма: «Определитель бактерий и актиномицетов» Н. А. Красильникова (1949), «Определитель микробов» Р. А. Циона (1948) и др. В определителе бактерий Д. Х. Берджи, девятое издание которого вышло в 1997 г., все прокариотические микроорганизмы объединены в царство *Procaryotae*, которое подразделяется на 4 отдела. Они, в свою очередь, делятся на секции, классы, порядки, семейства, роды, виды.

Отдел I. *Gracilicutes* (от *lam. gracilus* — тонкий, стройный, *cutes* — кожа). Включает грамотрицательные микроорганизмы. В отделе девять секций.

1. Спирохеты. Порядок *Spirochaetales*. Включает 2 семейства: *Spirochaetaceae* (четыре рода), *Leptospiraceae* (один род).

2. Спиралевидные и изогнутые аэробы (микроаэрофилы). Одно семейство — *spirillaceae*, в котором 6 родов. Патогенны для человека и животных микроорганизмы рода *Campylobacter*.

3. Грамотрицательные неподвижные изогнутые бактерии. Одно семейство — *spirosonaceae*, в котором патогенных три рода.

4. Аэробные грамотрицательные палочки, округлые и кокки. 8 семейств, 2 из которых имеют патогенные микроорганиз-

мы. Семейство *Pseudomonadaceae* включает 4 рода, более 25 видов, среди которых имеются патогенные (*Ps. mallei* и др.). Семейство *Neisseriaceae* имеет 16 родов. Роды *Neisseria* и *Moraxella* содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы. Роды *Bordetella*, *Brucella* и *Francisella* не внесены в семейства, содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы.

5. Грамотрицательные факультативные анаэробы. 3 семейства: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* и *Pasteurellaceae*. Семейство *Enterobacteriaceae* имеет 14 родов (*Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Ervinia*, *Shigella*, *Proteus*, *Versinia* и др.). Семейство *Vibrionaceae* имеет два рода. В род *Vibro* включены патогенные микроорганизмы. Семейство *Pasteurellaceae* имеет 3 основных рода: *Pasteurella*, *Haemophilus* и *Actinobacillus*. Содержат патогенные виды микроорганизмов.

6. Строгие анаэробы. Изогнутые грамотрицательные палочки. Одно семейство — *Bacteroidaceae*, в котором 13 родов, среди которых имеются патогенные.

7. Диссимилирующие и разлагающие сульфат бактерии. 7 непатогенных родов.

8. Анаэробные грамотрицательные кокки. Одно семейство — *Vellorellaceae*, в котором 3 рода.

9. Риккетсии и хламидии. Два порядка: *Rickettsiales* и *Chlamydiales*. Порядок *Rickettsiaceae* имеет 3 семейства: *Rickettsiales* (*Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* и *Anaplasmataceae*). Семейство *Rickettsiaceae* имеет три трибы, в которые внесено 8 родов. Семейство *Bartonellaceae* содержит 2 рода, а *Anaplasmataceae* — 4. Порядок *Chlamydiales* имеет одно семейство *Chlamydicaceae* и один род *Chlamydia*. Все семейства содержат патогенные микроорганизмы.

Отдел II. *Firmicutes* (от *лат.* *firmis* — крепкий, *cutes* — кожа). В отдел включены главным образом грамположительные бактерии.

10. Микоплазмы класса *Mollicutes* (от *лат.* *mollis* — мягкий, *cutes* — кожа). В классе один порядок — *Mycoplasmatales* — и 3 семейства: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*. В основном патогенные микоплазмы включены в семейство *Mycoplasmataceae*.

11. Эндосимбионты.

Отдел IV. *Mendosicutes*. Прокариоты, среди которых нет патогенных бактерий; метанобразующие, сероокисляющие, галофилы, микоплазмopodobные, термоацидофильные и другие наиболее древние по происхождению бактерии (архебактерии).

12. Грамположительные кокки. Два семейства: *Micrococcaceae* и *Deinococcaceae*. Семейство *Micrococcaceae* имеет четыре рода: *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*. В секцию, кроме указанных 2 семейств, внесены 10 самостоятельных родов: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus*, *Sarcina* и др.

13. Спорообразующие грамположительные палочки и кокки. 6 родов: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* и др. Первые два рода имеют патогенные виды.

14. Неспорообразующие грамположительные палочки. 7 родов: *Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipelotrix* и др. Имеются патогенные.

15. Неспорообразующие внутриклеточные грамположительные палочки. 21 род: *Corynebacterium*, *Micobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Asotobacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomices* и др.

16. Микобактерии. Одно семейство *Mycobacteriaceae*. Семейство имеет один род *Mycobacterium*, в котором 49 видов: *Myc. tuberculosis*, *Myc. bovis*, *Myc. avium* и др.

17. *Nocardioforms* — 9 родов: *Nocardia*, *Pseudococcus*, *Pseudonocardia* и др.

Отдел III. *Tenericutes*. Объединены грамотрицательные прокариоты без клеточной стенки, но имеющие цитоплазматическую мембрану.

Контрольные вопросы и задания

1. В чем отличия клетки прокариотов от клетки эукариотов?
2. Какие таксономические категории используют при классификации микроорганизмов?
3. Какую номенклатуру используют для обозначения видов микроорганизмов?
4. Какое понятие вкладывается в термин «вид микроорганизмов»?
5. Что такое штамм и клон?
6. Что такое чистая культура микроорганизма?

ГЛАВА 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

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

Бактерии невидимы невооруженным глазом, для их изучения используют световые и электронные микроскопы. Клетки бактерий измеряют в микрометрах, элементы тонкого строения — в нанометрах. Предел разрешения светового микроскопа составляет 0,2 мкм, а современных моделей электронных микроскопов — 0,15–0,3 нм. Средние размеры прокариот составляют 0,5–3 мкм. Наиболее стабильны размеры кокков — 0,5–2 мкм. Палочковидные формы обычно длиной 2–10 и шириной 0,5–1 мкм, мелкие палочки соответственно 0,7–1,5 и 0,2–2 мкм.

В 1967 г. Адлер описал мини-клетки, которые в 10 раз меньше исходных бактерий, не содержат хромосомную НК, а только плазмидную. Среди бактерий существуют гиганты длиной 125 мкм и более. Размеры спирохет составляют 0,2–0,75... 5–500 мкм.

По форме клеток бактерии подразделяют на три основные группы: шаровидные, или кокки, палочковидные и извитые (см. рис. 1).

Кокки (от *греч.* *kokkos* — зерно) имеют сферическую форму в виде правильного шара, эллипса, боба, ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают:

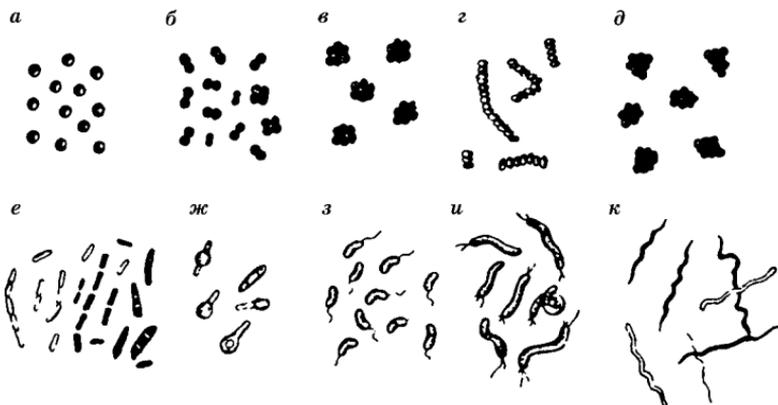


Рис. 1
Основные формы бактерий

микрোকки, или монококки, стафилококки, диплококки, стрептококки, тетракокки и сарцины.

Микрোকки делятся в разных плоскостях и располагаются одиночно, парами или беспорядочно.

Стафилококки (от др. греч. σταφυλή — виноград) делятся в различных плоскостях и располагаются несимметричными гроздьями, иногда одиночно, парами, тетрадами. К ним относятся сапрофиты и патогенные.

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

Стрептококки (от греч. streptos — цепочка) делятся в одной плоскости, располагаются в виде цепочки; встречаются одиночные и парные клетки. К ним относятся сапрофиты и патогенные.

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

Сарцины (от лат. sarcio — соединяю) делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и образуют правильные пакеты по 8–16 клеток и более. Сапрофиты встречаются в воздухе, почве, кишечнике животных и человека.

Палочковидные бактерии — самая многочисленная группа прокариот. Они имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму тела с округлыми, тупыми или заостренными концами. Палочковидные формы подразделяют на две группы: неспоровые палочки — бактерии (*Bacterium*) и палочки, образующие

споры, — бациллы (*Bacillus*). Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, называют клостридиями (*Clostridium*), они веретенообразные.

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

К палочковидным формам также относят коринебактерии и фузобактерии.

Коринебактерии (от *греч.* *согупе* — булава) — прямые или изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах. Это сапрофиты, они патогенны для животных и человека.

Фузобактерии — длинные, толстые, с заостренными концами палочки. Патогенные виды, являются возбудителем некробактериоза.

Извитые бактерии обладают спиральной симметрией. К ним относятся вибрионы, спириллы и спирохеты.

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

Спириллы (от *лат.* *spira* — изгиб) имеют форму спирально извитых палочек с 4–6 завитками. Обитают в пресной и морской воде. Преимущественно сапрофиты и патогенные виды.

Спирохеты (*spirochaeta* — извитые бактерии; от *греч.* *speira* — изгиб и *chaite* — длинные волосы) прокариоты спирально извитой формы. У них существует два типа завитков: первичные — образованные изгибами протоплазматического цилиндра, и вторичные — представляющие изгибы всего тела. Спирохеты — эластичные спиралевидные длинные клетки, состоящие из осевой нити (аксистиля), цитоплазмы с рибосомами и включениями, нуклеотида, мезосом, цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Тонкая эластичная клеточная стенка состоит из наружной липопротеидной мембраны и несплошного слоя пептидогликана. Осевая нить растянута на всю длину клетки, выполняет локомоторную и опорную функции, представляет собой пучок из 2–150 аксиальных (опорных) фибрилл, состоящих из аминоксахара кутина. Число и величина фибрилл у разных

видов неодинаковы. Протоплазматический цилиндр упакован спиралевидно и окружен аксиальными фибриллами, прикрепляющимися к дискам на его концах. Фибриллы заключены в перипласте (между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой). Движение спирохет происходит за счет активного сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра. Формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное.

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

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

Спирохеты и кристиспиры обитают в открытых водоемах или сточных водах; для позвоночных непатогенны. Кристиспиры — гигантские прокариоты (28–150 мкм) спирально изогнутой формы с плоской зернистой килевидной мембраной (креста) вдоль тела клетки. Число фибрилл более 100.

Трепонемы — спиралевидно извитые эластичные бактерии размером 0,1–0,5...5–20 мкм; осевая нить состоит из 1 или 4 фибрилл; четко выражены равномерные или неравномерные завитки; подвижны.

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

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

Морфологию спирохет изучают при помощи светового микроскопа в окрашенных препаратах, а в живом состоянии — в фазово-контрастном или темнопольном микроскопе. Спирохеты различают по способности окрашиваться: боррелии хорошо ок-

рашиваются обычными анилиновыми красителями, трепоне-мы, лептоспиры требуют специальных методов окраски. Наиболее широко распространен метод окраски по Романовскому — Гимзе.

Микробы чрезвычайно пластичны и легко изменяются под влиянием различных внешних факторов: температуры, питательной среды, концентрации солей, кислотности, продуктов метаболизма, дезинфицирующих агентов, лекарственных препаратов, ингибиторов организма.

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

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

2.2. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Клетка прокариотических организмов имеет сложное, строго упорядоченное строение и обладает принципиальными особенностями субмикроскопической организации и химического состава.

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные. Основные структуры — это клеточная

стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид; временная капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерий; у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки). Термин «оболочка» используют для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки; цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту (рис. 2).

Клеточная стенка — важный структурный элемент бактериальной клетки, она находится между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий это внешняя оболочка клетки. Она имеется у всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий.

Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме, а у многих видов патогенных бактерий токсична за счет поверхностных антигенов или несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. Клеточная стенка пронизана порами, через которые происходит транспорт экзотоксинов и других экзобелков бактерий. Толщина клеточной стенки 10–100 нм; она содержит от 5 до 50% сухого вещества клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является пептидогликан, или муреин, — опорный полимер сетчатой структуры, образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бак-

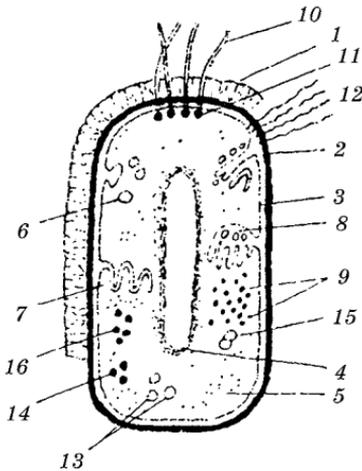


Рис. 2
Схема строения прокариотической клетки:

1 — капсула; 2 — клеточная стенка; 3 — цитоплазматическая мембрана; 4 — нуклеоид; 5 — цитоплазма; 6 — хроматофоры; 7 — тилакоиды; 8 — мезосома; 9 — рибосома; 10 — жгутики; 11 — базальное тельце; 12 — пили; 13 — включение серы; 14 — капли жира; 15 — гранулы полифосфата; 16 — плазмиды.

териальной клетки. Пептидогликан имеет основную цепь (остов), состоящую из чередующихся остатков N-ацетил-N-глюкозамина и кислоты, соединенных р-1,4-гликозидными связями; идентичные тетрапептидные боковые цепочки, прикрепляющиеся к молекулам N-ацетилмуравовой кислоты, и короткие поперечные пептидные мостики, связывающие полисахаридные цепи. Два типа связей (гликозидные и пептидные) между субъединицами пептидогликана придают этому гетерополимеру структуру молекулярной сети. Остов пептидогликанового слоя у всех видов бактерий одинаков, а тетрапептидные боковые цепочки и пептидные (поперечные) различны.

Все бактерии в зависимости от окраски по Граму подразделяют на две группы: грамположительные и грамотрицательные. В 1884 г. Х. Грам предложил метод окраски, который был использован для дифференцирования бактерий. Сущность метода состоит в том, что грамположительные бактерии прочно фиксируют комплекс генцианвиолета и йода, не обесцвечиваются этанолом и поэтому не воспринимают дополнительный краситель фуксин, оставаясь окрашенными в фиолетовый цвет. У грамотрицательных бактерий этот комплекс легко вымывается из клетки этанолом, и после дополнительного нанесения фуксина они окрашиваются в красный цвет. Некоторые бактерии положительно окрашиваются только в стадии активного роста.

Способность прокариот окрашиваться по методу Грама или обесцвечиваться этанолом обусловлена спецификой химического состава и ультраструктурой их клеточной стенки. Содержание пептидогликана — основного компонента клеточной стенки — у грамположительных бактерий составляет от 50 до 90%, у грамотрицательных — 1–10%. Структурные микрофибриллы пептидогликана у грамотрицательных бактерий связаны менее компактно, поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий, поэтому фиолетовый комплекс генцианвиолета и йода у них вымывается быстрее.

Протопласты и сферопласты. Протопласты — это формы прокариот, полностью лишенные клеточной стенки, образуемые обычно грамположительными бактериями. Сферопласты — бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой с сохранением элементов наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных

бактерий и значительно реже — у грамположительных. Образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана пенициллином в среде с соответствующим осмотическим давлением.

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

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

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

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

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

L-формам отводится большое значение в развитии хронических рецидивирующих инфекций, носительстве возбудителей, длительной персистенции их в организме. Доказана трансплацентарная инвазивность элементарных тел L-форм бактерий. Инфекционный процесс, вызванный L-формами бактерий, характеризуется атипичностью, длительностью течения, трудно поддается химиотерапии.

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

Цитоплазматическая мембрана представляет собой белково-липидный комплекс, состоящий из 50–75% белков и 15–20% липидов. Основная часть мембранных липидов (70–90%) представлена фосфолипидами. Она построена из двух мономолекулярных белковых слоев, между которыми расположен липидный слой в виде двух рядов правильно ориентированных молекул липидов.

Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера клетки, контролирует поступление питательных веществ и выход продуктов метаболизма наружу; ее субстратспецифические

ферменты — пермеазы, осуществляют активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

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

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

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

Цитоплазма. Содержимое бактериальной клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Состоит из цитозоля — гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты РНК, вещества субстрата, ферменты, продукты метаболизма, и структурных элементов — рибосом, внутрицитоплазматических мембран, включений и нуклеоида.

Рибосомы — органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями. Бактериальные рибосомы — гранулы диаметром 15–20 нм — имеют константу седиментации 70S (S — единица Сведберга) и образованы из двух рибонукле-

опротеидных субъединиц: 30S и 50S. Одна бактериальная клетка содержит от 5000 до 50 000 рибосом, которые посредством иРНК объединены в полисомы — агрегаты, состоящие из 50–55 рибосом, обладающих высокой белоксинтезирующей активностью.

В цитоплазме бактерий присутствуют (непостоянно) различного типа включения: твердые, жидкие и газообразные, с белковой мембраной или без нее. Значительная их часть представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживают гликоген и крахмалоподобное вещество гранулезу, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. Липиды накапливаются в клетках в виде гранул и капелек жира, к ним относятся окруженные мембраной гранулы поли- β -оксимасляной кислоты, резко преломляющие свет и хорошо различимые в световом микроскопе. Выявляются у бациллы антракса и аэробных спорообразующих сапрофитных бактерий. Микобактерии в качестве запасных веществ накапливают воски. В клетках некоторых коринебактерий, спирилл и других содержатся гранулы волютина, образованные полифосфатами. Они характеризуются метахромазией: полуидиновый синий, метиленовый синий окрашивают их в фиолетово-красный цвет. Волютиновые гранулы играют роль фосфатного депо.

К включениям, окруженным мембраной, также относятся газовые вакуоли, или аэросомы, они снижают удельную массу клеток; встречаются у водных прокариот.

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

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки, гистоны отсутствуют; хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий — на мезосоме. Бактериальная хромосома реплицируется полуконсервативным способом: родительская двойная спираль ДНК раскручивается и на матрице каждой полинуклеотидной

цепи собирается новая комплементарная цепочка. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивает рост цитоплазматической мембраны.

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

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

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

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.). У некоторых видов бацилл капсулы построены из полипептида. Так, в состав капсулы *B. anthracis* входит полипептид d-глутаминовой кислоты (правовращающий изомер). В состав микрокапсулы микобактерий туберкулеза млекопитающих входят гликопептиды, представленные сложным эфиром трегалозы и миколовой кислоты (корд-фактор).

Синтез капсулы — сложный видоспецифический процесс у различных прокариот. Считают, что биополимеры капсулы син-

тезируются на наружной поверхности цитоплазматической мембраны и выделяются на поверхность клеточной стенки в определенных специфических ее участках.

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

Капсула — полифункциональный органоид, выполняющий важную биологическую роль, так как служит местом локализации капсульных антигенов, определяющих вирулентность, антигенную специфичность и иммуногенность бактерий. Утрата капсулы у патогенных бактерий резко снижает их вирулентность, пример тому — бескапсульные штаммы бациллы антракса. Капсулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм — от действия защитных сил макроорганизма: инкапсулированные клетки плохо фагоцитируются. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату.

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

Для окрашивания капсул применяют специальные методы: Романовского — Гимзы, Гинзы — Бурри, Ольта, Михина и др.

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

Жгутики — органы движения бактерий в виде тонких, длинных, нитевидных структур белковой природы (см. рис. 3).

Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10–20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80–90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) — это полый спиральный цилиндр диаметром 12–20 нм. У вибрионов и протей нить окружена футляром толщиной 35 нм.

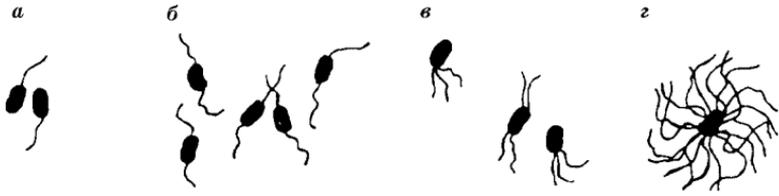


Рис. 3.
Жгутики:

а — монотрихи; б — амфитрихи; в — лофотрихи; г — перитрихи.

Жгутик состоит из спиральной нити, крюка и базального тельца. Крюк — изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связующего звена между базальным тельцем и жесткой нитью жгутика. Базальное тельце является сложной структурой, состоящей из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не относятся к жизненно важным структурам бактериальной клетки: существуют фазовые вариации бактерий, когда в одной фазе развития клетки они имеются, в другой — отсутствуют. Так, у возбудителя столбняка в старых культурах преобладают клетки без жгутиков. Наличие жгутиков у бактерий зависит от температуры их выращивания.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий:

- монотрихи — бактерии с одним полярно расположенным жгутиком;
- амфитрихи — бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах;
- лофотрихи — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки;
- перитрихи — бактерии с множеством жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей ее поверхности (рис. 3). Бактерии, не имеющие жгутиков, называют **атрихиями**.

Будучи органами движения, жгутики типичны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное перемещение в жидкой среде и более медленное —

по поверхности твердых субстратов. Скорость движения монотрихов и лофотрихов достигает 50 мкм/с, амфитрихи и перитрихи движутся медленнее и обычно за 1 с перемещаются на расстояние, равное размерам их клетки.

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

- хемотаксис — происходит в результате разницы в концентрации химических веществ в среде;
- аэротаксис — кислорода;
- фототаксис — интенсивности освещения;
- магнитотаксис обусловлен способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.

Выявление подвижных жгутиковых форм бактерий служит для их идентификации при лабораторной диагностике инфекционных болезней.

Пили (фимбрии, ворсинки) — прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3–25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Образованы специфическим белком — пилином; берут начало от цитоплазматической мембраны, встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе (рис. 4).

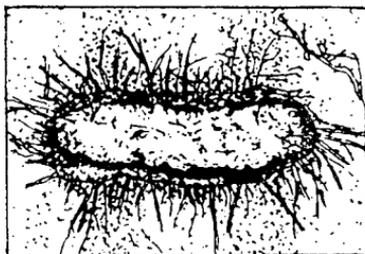


Рис. 4
Пили

На поверхности клетки может быть от 1–2, 50–400 пилей до нескольких тысяч.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют фимбриями. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. Половые пили на поверхности бактерий в процессе конъюгации выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

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

Споры (эндоспоры) бактерий — особое состояние покоящихся репродуктивных клеток, характеризующееся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется эндоспорой. Способностью к образованию спор обладают преимущественно палочковидные грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, из шаровидных бактерий — лишь единичные виды. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

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

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

В световом микроскопе споры видны в виде овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером 0,8–1,0...1,2–1,5 мкм; они могут располагаться центрально, субтерминально — ближе к концу, терминально — на конце палочек. Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена сердцевинной, или спороплазмой, содержащей нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембраны структуры. Спороплазма окружена цитоплазматической мембраной, к которой прилега-

ет зачаточный пептидогликановый слой, затем специфическим для спор массивным слоем кортекса, или коры. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора окружена многослойной оболочкой. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается экзоспорум.

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

Процесс образования спор включает ряд последовательных стадий.

Подготовительная — изменяется метаболизм, завершается репликация ДНК и происходит ее конденсация. Клетка содержит два или более нуклеоида, один из них локализуется в спорогенной зоне, остальные — в цитоплазме спорангия. Одновременно синтезируется дипиколиновая кислота.

Стадия предспоры — со стороны цитоплазматической мембраны вегетативной клетки происходит вращение двойной мембраны, или септы, отделяющей нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы (спорогенная зона). В результате чего образуется проспора, окруженная двумя мембранами.

Образование оболочек — между мембранами споры образуется зачаточный пептидогликановый слой, затем над ним откладывается толстый пептидогликановый слой кортекса и вокруг его наружной мембраны формируется споровая оболочка.

Созревание споры — завершение образования всех структур споры; она приобретает термоустойчивость, характерную форму и занимает определенное положение в клетке.

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

Споры бактерий устойчивы к действию высоких температур, химических соединений, в том числе органических

растворителей и поверхностно-активных веществ; могут длительное время (десятки, сотни лет) существовать в покоящемся состоянии.

Некоторые виды бактерий одновременно со спорами образуют **параспоровые тельца**, которые не являются элементами или компонентами бактериальной клетки. У *B. anthracis* это сферические образования правильной формы диаметром 120–200 нм, расположенные изолированно или же на поверхности спор. В клетках *B. Anthracis* споровые тельца формируются в виде крупных белковых кристаллов. Они токсичны и их используют для приготовления препарата, предназначенного для борьбы с вредными насекомыми.

2.3. ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И СТРОЕНИЯ ДРУГИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

2.3.1. АКТИНОМИЦЕТЫ

Актиномицеты (лучистые грибы) (от *лат.* *actis* — луч; *mykes* — гриб) — одноклеточные грамположительные микроорганизмы, внешне сходные с мицеллярными грибами. Их тело (мицелий) состоит из тонких (0,05–2,0 мкм) и длинных гиф (нитей), способных к истинному ветвлению; гифы могут быть прямыми или спиралевидными и имеют единую с основной нитью оболочку и протопласт. На плотных средах актиномицеты образуют субстратный, растущий в среду воздушный мицелий. Кроме мицеллярных встречаются палочковидные и кокковидные формы. Строение актиномицетов аналогично грамположительным бактериям, клеточная стенка содержит пептидогликан и не имеет, как у грибов, хитина и целлюлозы. Размножаются при помощи спор (конидий); из отдельных ветвей зрелых гиф воздушного мицелия образуются спораносцы, которые в результате фрагментации или сегментации превращаются в споры. В благоприятных условиях они прорастают в вегетативные клетки.

Для актиномицетов характерен гетеротрофный тип питания и аэробный (окислительный) тип получения энергии; существуют и анаэробы. Отдельные виды синтезируют пигмен-

ты: розовый, желтый, синий и др. Обитают преимущественно в почве, присутствуют в воде, на растениях, коже и слизистых оболочках животных; разлагают органические субстраты, в том числе недоступные для других микроорганизмов. Играют важную роль в круговороте веществ и энергии, образовании почвы и ее плодородии. Многие актиномицеты служат продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов. Большинство из них сапрофиты, но есть и патогенные. К ним относится *Actinomyces bovis* — возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота.

2.3.2. РИККЕТСИИ

Риккетсии — мелкие внутриклеточные бактерии, выделенные в отдельную группу; вызывают у животных и человека специфические болезни — риккетсиозы. Риккетсии — короткие с закругленными концами палочки размером 0,2–0,3...0,3–1,0 мкм, располагаются одиночно или парами, спор не образуют, неподвижны, грамтрицательны, размножаются поперечным делением. Имеют клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, рибосому, ядерный аппарат, синтезируют белок, ДНК, РНК, АТФ, ферменты промежуточного обмена. Цитоплазматическая мембрана отличается высокой проницаемостью, что обусловлено их паразитическим образом жизни. Риккетсии не растут на обычных питательных средах, для их культивирования применяют куриные эмбрионы или культуры клеток животных. Чувствительны к действию температуры и химических факторов. Патогенные виды у животных вызывают Ку-лихорадку, гидроперикардит инфекционный, риккетсиозный моноцитоз, риккетсиозный кератоконъюнктивит и другие болезни.

2.3.3. ХЛАМИДИИ

Хламидии — внутриклеточные облигатные паразиты, отличающиеся от других микроорганизмов циклом развития и механизмом адаптации к внутриклеточным условиям. Относятся к семейству *Chlamydiaceae*; возбудители инфекционных болезней животных и человека. Хламидии не производят собственную АТФ, а зависят от энергии клетки. В результате подавления хламидиями синтеза клеточной ДНК энергия клетки переключается на синтез ДНК и протеина хламидий.

Поражающие животных хламидии обладают тканевым тропизмом, но им не присуща хозяиноспецифичность, что способствует их распространению среди разных видов. В пораженных клетках обнаруживают инфекционные элементарные частицы — округлые, диаметром 250–350 нм, которые образуются в конце внутриклеточного цикла развития хламидии и содержат РНК и ДНК. В начале инфекции в цитоплазме формируется матрикс, затем появляются крупные элементарные частицы, у которых отсутствует нуклеоид, а оболочка не сформирована; они неустойчивы во внешней среде, чувствительны *in vitro* к антибиотикам и не обладают инфекционностью. В конце инфекционного процесса появляются мелкие зрелые элементарные частицы, которые имеют ДНК-содержащий нуклеоид и плотную трехслойную оболочку; они устойчивы во внешней среде, не чувствительны *in vitro* к антибиотикам, обладают инфекционными свойствами. В зараженных клетках при световой микроскопии обнаруживают также цитоплазматические включения, которые окрашиваются по Романовскому в красновато-фиолетовый цвет (незрелые) и в сине-фиолетовый (зрелые, содержащие элементарные частицы). Зрелые элементарные частицы окрашиваются акридином оранжевым в желто-зеленый и зеленый цвет, незрелые — в ярко-красный. Хламидии обладают видовым и групповым антигенами.

Хламидии устойчивы во внешней среде. Выделяясь с фекалиями животных, сохраняют жизнеспособность (и на перьях птиц) в течение нескольких месяцев. 2%-й хлорамин, 3%-й лизол, 5%-й NaOH разрушают хламидии в течение 3 ч; нагревание до 70°C — в течение 15 мин. Выделяют и культивируют хламидии на куриных эмбрионах, белых мышах, в культуре клеток. Быстрая идентификация основана на обнаружении цитоплазматических включений и элементарных частиц. Инфекции, вызванные хламидиями, установлены у птиц (орнитоз), крупного рогатого скота (энцефалит, энцефаломиелит, аборт, гепатопатия, пневмония, вульвовагинит, гранулезный энтерит, орхит, полиартрит), мелкого рогатого скота (аборт, пневмония, кератоконъюнктивит, полиартрит), свиней (бронхопневмонии, перикардит). Хламидии поражают также лабораторных и диких животных, у которых отмечено бессимптомное носительство.

2.3.4. МИКОПЛАЗМЫ

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

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

2.3.5. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ

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

Грибы — бесхлорофильные низшие эукариотические организмы, использующие для питания только органические вещества. Вегетативное тело грибов — грибница, или мицелий, состоит из ветвящихся нитей, называемых гифами. У низших одноклеточных грибов гифы не разделены поперечными перегородками (септами) на отдельные участки. У высших грибов мицелий септирован. Мицелий может развиваться на поверхности и в толще субстрата, проникая внутрь. Толщина (поперечник) гиф составляет 5–50 мкм и более.

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

Хитридиомицеты — примитивные низшие одноклеточные организмы. Мицелий отсутствует или в зачаточном состоянии. Клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Размножение бесполое и половое. Преимущественно обитают в

водоемах. Некоторые виды вызывают болезни сельскохозяйственных растений.

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

Зигомицеты — мицелий хорошо развит, многоядерный, несептированный (низшие грибы). Клеточная оболочка содержит хитин, иногда глюкан. Размножаются спорангиоспорами, реже конидиями или половым путем. Широко распространены в верхнем слое почвы, развиваются на органических остатках растений. Используют в микробиологической промышленности с целью получения соевого сыра, спирта из картофеля, антибиотика рамицина и др. Типичными представителями этого класса являются грибы рода мукор (головчатая плесень). У мукора (рис. 5) от одноклеточного мицелия отходят бесцветные спорангиеносцы, на верхушке которых развивается по одному спорангию.

При наличии влаги оболочка зрелого спорангия легко растворяется, освобождая несколько тысяч спорангиоспор, которые затем прорастают. У животных и человека могут вызывать мукоромикозы.

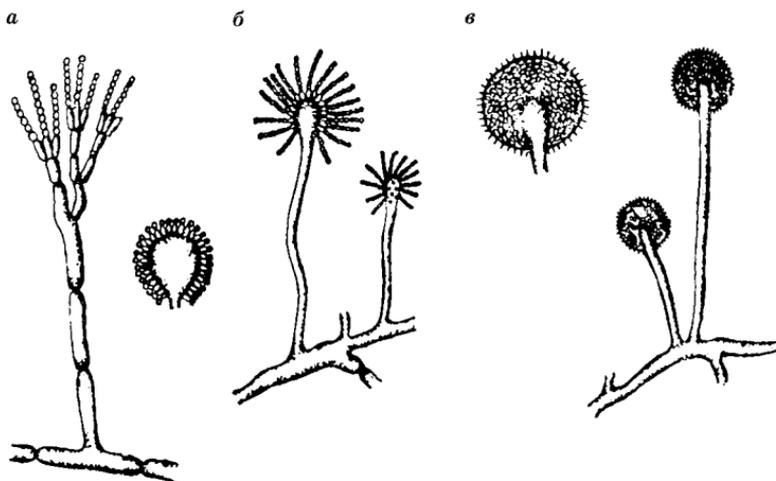


Рис. 5
Морфология плодonoшения у грибов:

а — пеницилл; б — аспергилл; в — мукоровых.

Аскомицеты, или сумчатые грибы, — высшие грибы с разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение вегетативное, бесполое (при помощи конидий) и половое (сумчатая стадия). В результате полового процесса возникают аски, или сумки, внутри которых после слияния ядер половых клеток (гамет) образуются аскопоры — обычно восемь в одном аске. Широко распространены в природе, известно около 30 тыс. видов. Обитают в почве, органических субстратах, кормах, пищевых продуктах, вызывая их порчу. Паразитируют на растениях, животных, разрушают целлюлозу. Токсические виды способны вызвать микотоксикозы. Используют как продуценты антибиотиков, алкалоидов, ростовых веществ (гиббереллинов), ферментов. К аскомицетам относятся некоторые съедобные грибы — сморчок, трюфель.

Базидиомицеты — высшие грибы с многоклеточным мицелием. Специальным органом плодоношения служит базидия. Базидии образуют наружные споры на концах гиф в результате полового процесса. К базидиомицетам относятся сапрофиты и факультативные паразиты хлебных злаков (головня, ржавчина), а также съедобные и ядовитые шляпочные грибы.

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

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

У грибов рода пеницилл (кистевик) мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части конидиеносцы разветвлены в виде кисти руки, их последние сегменты заканчиваются

конидиями. Образуют зеленый, белый и другие пигменты. Обитают в почве, сырых помещениях, кормах, пищевых продуктах.

К несовершенным грибам относят и дерматофиты — возбудители микроспории, трихофитии, фавуса (парши) животных, а также дрожжеподобные грибы, вызывающие кандидоз и криптококкоз.

Дрожжи — безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы. Филогенетически гетерогенная группа организмов, часть из которых типичные аскомицеты, другие — базидиомицеты, третьи — дейтеромицеты. Это крупные сферические палочковидные клетки размером 3–7 мкм; удлиненные формы могут быть и более 20 мкм.

В специальной литературе часто встречается собирательный термин «плесени» («плесневые грибы»). Это нитчатые, микроскопические грибы разных классов, способные образовывать субстратный и воздушный мицелий, например мукор, аспергиллы и др.

Клетки микроскопических грибов разнообразны по форме, размерам, но имеют общие структурные элементы. Клетка всех грибов состоит из клеточной стенки, цитоплазмы с цитоплазматической мембраной и эндоплазматической сетью, митохондриями, рибосомами, включениями, вакуолями, ядром или несколькими ядрами (рис. 6).

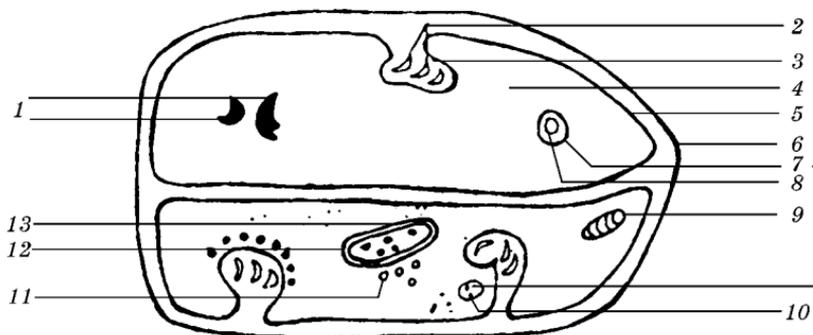


Рис. 6

Схема строения клетки гриба:

1 — гликоген; 2 — аппарат Гольджи; 3 — мезосома; 4 — протоплазма; 5 — цитоплазматическая мембрана; 6 — клеточная стенка; 7 — вакуоли; 8 — жир; 9 — митохондрия; 10 — метахроматин; 11 — рибосомы; 12 — ядрышко; 13 — ядро.

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

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

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

Клеточная стенка служит защитным приспособлением и предохраняет грибную клетку от воздействия различных факторов окружающей среды, например осмотическим барьером, обуславливающим избирательную проницаемость для различных веществ. Она придает форму вегетативным клеткам гиф и органов размножения. На поверхности клеточной стенки и цитоплазматической мембраны локализованы ферменты, осуществляющие превращение не усвояемых клеткой (не растворимых в воде) полимеров.

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

Основные компоненты клеточной стенки грибов — хитин, глюканы, белок и жиры. Азотистые и безазотистые полисахариды с жировыми веществами образуют растворимые и нерастворимые комплексы. Основу клеточной стенки составляют 4–6 моносахаров, соотношение которых у различных грибов значительно варьирует. В состав полисахаридных фракций входят

глюкозамин, манноза, глюкоза, ксилоза и др. Следует подчеркнуть, что состав клеточной оболочки различных клеток одного и того же гриба неодинаковый.

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

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

Основное функциональное назначение цитоплазматической мембраны заключается в следующем: осуществление поступления в клетку различных веществ, ферментативная переработка и выделение продуктов метаболизма. Переработанные вещества поступают в протопласт клетки и участвуют в обмене веществ.

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

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

Рибосомы — округлые зерна рибонуклеопротеидной природы размером до 200 Е, принимают участие в синтезе клеточных белков. Количество рибосом значительно отличается у различ-

ных видов грибов и зависит от внешних факторов, возраста культуры и др.

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

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

Липосомы — капельки жировых веществ, окруженные однослойными мембранами.

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

В грибных клетках имеются многочисленные включения: волютин, гликоген, липиды, пигменты, миелоидные образования, соли органических кислот, аминокислоты и др. Считается, что гликоген ответствен за эндогенное дыхание, а волютин служит запасным питательным веществом, участвующим в энергетических процессах.

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

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

Мицелий представляет собой узкую круглую трубку, диаметр которой варьирует у микромицетов от одного до нескольких микрон. Ветвящиеся трубочки — гифы, составляющие

мицелий, дифференцируют на более толстые слабо разветвленные и тонкие сильноветвящиеся. Первые формируют мицелий, главным образом развивающийся на субстрате, вторые — в толще субстрата для поглощения из него питательных веществ. Такая дифференцировка особенно характерна для мицелия некоторых паразитных грибов, но встречается нередко и среди сапрофитных форм. Длина клеток мицелия колеблется от нескольких микрон до десятков и, реже, сотен микрон.

При обильном ветвлении гифы мицелия, соприкасаясь друг с другом, могут срастаться и образовывать анастомозы. При наличии большого их количества мицелий приобретает характерный сетчатый вид. Развитие анастомозов наблюдается у различных грибов с многоклеточным мицелием. Благодаря им возможно перемещение клеточного ядра из одной клетки в другую и переход от гаплоидного к диплоидному мицелию. Однако в большинстве случаев они осуществляют вегетативные функции и развиваются у многих форм при недостатке питания.

Мицелий окружен двухконтурной оболочкой, которая у молодых культур более нежная; в перегородках, делящих мицелий на отдельные клетки, имеются поры, через которые в процессе роста переливается цитоплазма, а с ней и питательные вещества. В клетках много различных включений: в старых цитоплазма становится зернистой из-за множества вакуолей. Молодой мицелий состоит из удлиненных прямоугольных клеток, старый — из коротких округлых или многогранных.

Мицелий, имеющий перегородки, называется септированным. Однако у некоторых низших грибов мицелий состоит из гиф, лишенных поперечных перегородок, и представляет собой как бы одну, сильно разветвленную гигантскую клетку с многочисленными ядрами и называется несептированным мицелием.

Как происходит развитие мицелия? Из споры выпячивается ростковая трубочка, которая удлиняется и затем отчленяется перегородкой от средней, включающей спору. Ростовые трубочки затем еще удлиняются и получают новую перегородку, разделяясь на дистальную, или верхушечную, клетку и проксимальную или внутреннюю. В дальнейшем верхушечная клетка удлиняется и вновь делится, отделяя вторую, более молодую по сравнению с первой, внутреннюю клетку. В этом про-

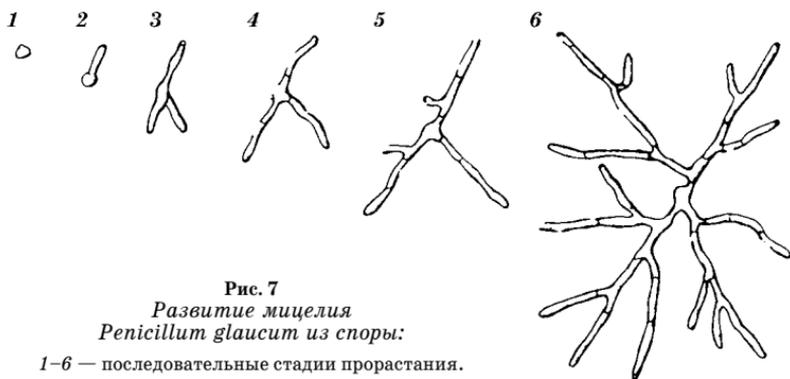


Рис. 7
Развитие мицелия
Penicillium glaucum из споры:
 1-6 — последовательные стадии прорастания.

цессе внутренние клетки только вытягиваются, поперечное деление их происходит редко, но зато из них развиваются боковые ветви. На дистальном конце внутренней клетки образуется боковое выпячивание, принимающее цилиндрическую форму и отделяющееся затем перегородкой от производящей ее клетки. Новая клетка вырастает затем в боковую ветвь, развивающуюся и ветвящуюся таким же образом, как и главная. Благодаря формированию ветвей на протяжении главной гифы они тем старше и сильнее развиты, чем ближе к основанию лежит место их отхождения — акропетальное ветвление (рис. 7).

Развитие несептированного мицелия происходит аналогично, но без образования поперечных перегородок. Рост происходит на кончиках гиф, где накапливается обильная протоплазма, заполняющая весь просвет, а в задних частях происходит значительное развитие центральных вакуолей. В однородной среде, например на поверхности питательного желатина, гифы мицелия (как неклочного, так и многоклеточного) разрастаются равномерно и радиально, так что мицелий имеет форму круга, нарастающего с краев. Центральная часть в нем самая старая, даже иногда отмершая, а периферическая — наиболее молодая.

При общем однообразии развития мицелия, который можно назвать типичным, в отдельных случаях наблюдается ряд специфических черт как макроскопического вида и общего характера роста, так и микроскопического строения. Макроскопический вид мицелия определяют прежде всего воздушные гифы. В одних случаях они формируются на самой поверхности

субстрата и отчасти внутри его, тогда мицелий имеет вид плоского, прижатого к субстрату кружка; в других случаях, кроме того, развиваются более или менее обильные гифы, поднимающиеся в воздух и придающие мицелию некоторое сходство, например, с куском ваты, возвышающимся над субстратом.

Характер роста может быть различным у одного и того же гриба в зависимости от влажности, питания и др. Однако ряд форм грибов имеет специфические особенности, например образование пышного воздушного мицелия.

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

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

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

Грибы, паразитирующие на растениях, иногда формируют специальные ответвления мицелия — гаустории, которые, проникая непосредственно в клетки растений, обеспечивают питание грибов. Для гаусторий типично резкое изменение характера их роста по сравнению с ростом типичного мицелия, что объясняется воздействием протоплазмы живой клетки хозяина.

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

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

шены. Зрелые склероции содержат меньше влаги по сравнению с мицелием и много запасных веществ — липидов, гликогена.

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

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

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

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

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

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

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

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

Хламидоспоры — это изменения мицелия в зрелых и старых культурах на концах или по его ходу. Основная функция хламидоспор не размножение, а сохранение вида. Форма их обычно круглая, овальная или слегка удлинённая, диаметр превышает диаметр мицелия. У некоторых грибов стенка двухконтурная, поверхность гладкая или шероховатая. Хламидоспоры могут возникать на концах мицелия, тогда они называются терминальными, по ходу мицелия — интерполярными (промежуточными).

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

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

У совершенных грибов споры подразделяют на ооспоры, зигоспоры, аскоспоры, базидиоспоры, эндоспоры, фиалоспоры, хламидоспоры.

Споры несовершенных грибов в соответствии с размерами и происхождением также делят на несколько групп. К эндоспорам, образующимся внутри мицелия путем сегментации последнего, относят таллоспоры, включающие артроспоры, хламидоспоры и бластоспоры. Кроме того, для несовершенных грибов характерно образование конидий, макроконидий, алейриЙ (микроконидий) и гемиспор, считающихся несовершенными конидиями.

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

2.4. ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Тинкториальные свойства микроорганизмов характеризуют их способность вступать в реакцию с красителями и окрашиваться определенным образом.

Для окрашивания микроорганизмов используют простой и сложный методы. При **простом методе** окраски пользуются одним красителем: разведенным фуксином (1–2 мин), щелочной метиленовой синью Леффлера (3–5 мин). Фиксированный препарат помещают мазком вверх на подставку. На мазок пипеткой наносят краситель так, чтобы он весь был покрыт раствором. По истечении необходимого времени краситель сливают, препарат промывают водой и высушивают между листами фильтровальной бумаги или на воздухе. На сухой мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют препарат иммерсионным объективом оптического микроскопа. **Простой метод окрашивания препаратов позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, изучить их морфологию (форму, расположение).**

К **сложным методам** относится окраска по Граму, Циль — Нильсену, Златогорову, Михину, Ольту и т. д. Эти методы, как и простые, позволяют обнаружить бактерии в исследуемом материале и изучить их морфологические особенности. **Вместе с тем они дают возможность выявить различия химического состава бактериальной клетки (окраска по Граму), а также установить ее структурные особенности — наличие спор, капсул и др.** Все эти признаки учитываются в лабораторной практике при определении вида бактерий.

2.4.1 ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ

Для окраски препаратов для световой микроскопии в лабораторной практике наиболее широко применяют анилиновые красители. Выделяют две группы красителей:

- кислые, у которых красящим элементом (хромофором) является анион, — эозин, кислый фуксин; эти красители преимущественно окрашивают цитоплазматические элементы клеток;

- основные, у которых красящим элементом (хромофором) является катион, — метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин; эти красители преимущественно окрашивают структуры клеточных ядер.

При изучении препаратов с целью идентификации микроорганизма достаточно выявить ряд характерных признаков, таких как размер, форма, взаимное расположение клеток, а также восприятие красителей в различных условиях, и нет необходимости в детальном изучении клеточной структуры. В связи с этим для окраски применяют преимущественно основные красители, так как высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетках делает их более чувствительной именно к ним.

Методы окраски в зависимости от цели исследования можно разделить на две категории:

- простые, когда вся клетка окрашивается одним красителем, что позволяет хорошо различать ее форму и размеры;
- дифференциальные, когда окрашиваются определенные структуры и вещества клетки, что позволяет выявить характерные признаки микроорганизма и идентифицировать его.

МЕТОДИКА ПРОСТОЙ ОКРАСКИ ФИКСИРОВАННОГО МАЗКА

Предметное стекло с препаратом помещают на параллельные стеклянные палочки над кюветой и наносят несколько капель красителя (фуксин, генцианвиолет). Для того чтобы осадок, неизбежно образующийся в растворе красителя при хранении, не загрязнял препарат, перед нанесением красителя на мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги.

Окрашивают 1–5 мин, время окраски подбирают в зависимости от концентрации красителя и от свойств исследуемого микроорганизма.

В лабораторной практике широко используется модификация метода окраски Синева: фильтровальную бумагу пропитывают красителем, высушивают и режут на полоски размером с предметное стекло. При окрашивании кладут на препарат полоску и добавляют несколько капель воды.

В редких случаях, когда клетки не окрашиваются или окрашиваются неравномерно, помимо увеличения времени окраски допустимо нагревание или добавление поверхностно-активных веществ для того, чтобы краситель проник через клеточную стенку.

При окраске большого количества препаратов краситель наливают в емкость и погружают препараты на 0,5–1 мин.

Остатки красителя смывают водой до тех пор, пока вода не станет бесцветной. Препарат высушивают и просматривают под иммерсией при $\times 90$. В правильно окрашенном препарате на чистом светлом фоне четко выделяются клетки микроорганизмов.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Окраска препарата по Граму. Способность микроорганизмов окрашиваться красителями триметилфенолового ряда является важным дифференциально-диагностическим признаком. Микроорганизмы можно разделить на две большие группы:

- грамположительные, которые характеризуются повышенным содержанием магниевых солей рибонуклеиновой и тейхоевой кислот мукополисахаридов, а также полифосфатнуклеотидов, они способствуют образованию стойкого комплекса с красителями трифенилфенолового ряда в присутствии ионов йода;
- граммотрицательные, отличающиеся тем, что вышеперечисленные вещества содержатся в их химическом составе в незначительном количестве и соответственно не удерживают красители триметилфенолового ряда.

Для регистрации образования стойкого комплекса используют кратковременную обработку спиртом и последующее окрашивание дополнительным красителем: грамположительные микроорганизмы в результате остаются синими (фиолетовыми), а граммотрицательные — обесцвечиваются спиртом и окрашиваются в цвет дополнительного красителя.

В настоящее время известно большое количество модификаций методики окраски по Граму, в лаборатории для стабильности результатов необходимо отработать и использовать одну и ту же методику.

При окраске по Граму желательно использовать контроль: проводить параллельное окрашивание известных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Перед приготовлением мазка культуру исследуемого микроорганизма суспендируют в 5% -м формалине, а затем промывают центрифугированием.

Готовят препарат «мазок» исследуемой культуры в центре покровного стекла, а по краям — мазки грамположительного и грамотрицательного микроорганизмов для контроля. Важным моментом является приготовление как можно более тонких мазков.

Для приготовления мазка с целью окраски по Граму можно использовать культуру с жидкой или плотной средой. Однако гораздо лучше результаты получаются при приготовлении мазка из фиксированной формалином отмытой пробы: размер и форма клеток хорошо сохраняются, клетки прокрашиваются равномерно, а беспорядочно разбросанные преципитаты из жидких культуральных сред отсутствуют.

Правильная реализация метода окраски по Граму требует окрашивать клетки молодых (суточных) культур, так как после прекращения роста многие микроорганизмы теряют способность удерживать краситель, что приводит к нестабильным недостоверным результатам:

- 1) препарат высушивают, фиксируют и окрашивают 1–2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым;

- 2) сливают краситель и обрабатывают препарат 1–2 мин раствором Люголя до почернения;

- 3) сливают раствор Люголя и обесцвечивают 0,5–1,0 мин 96% -м этиловым спиртом;

- 4) промывают в слабой, идущей под углом струе водопроводной воды;

- 5) окрашивают 1–2 мин водным фуксином;

- 6) промывают водой;

- 7) препарат высушивают и микроскопируют под иммерсией при $\times 90$.

В правильно окрашенном препарате на чистом светлом фоне четко выделяются клетки микроорганизмов: грамположительные микроорганизмы имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — розово-красный.

Некоторые бактерии дают грамположительный результат лишь в течение нескольких делений после прорастания спор.

Грамотрицательные микроорганизмы выглядят как грамположительные, если обесцвечивание произведено не до конца. Грамположительные микроорганизмы выглядят как грамотрицательные, если нарушена целостность клеточной стенки в результате аутолиза.

Важным дифференциально-диагностическим признаком является кислотоустойчивость. Кислотоустойчивые микроорганизмы (актиномицеты, микобактерии) характеризуются высоким содержанием в своем химическом составе сложных липидов, в частности, миколовых кислот, в связи с этим при окрашивании и последующей обработке кислотой они не обесцвечиваются.

Наиболее распространенным методом выявления кислотоустойчивости является окраска по Цилю — Нильсену:

1) готовят препарат «мазок» исследуемой культуры на одном краю покровного стекла, а на другом — мазок культуры кислотоустойчивого микроорганизма;

2) препарат высушивают, фиксируют и окрашивают;

3) на препарат кладут фильтровальную бумагу и наносят раствор карболового фуксина Циля;

4) прогревают препарат высоко над пламенем горелки 2–3 раза, отодвигая препарат в сторону при появлении паров и нагревая вновь;

5) после остывания препарата снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой;

6) погружают в кювету с 5% -м раствором H_2SO_4 на 1–2 с и сразу же промывают в слабой, идущей под углом струе водопроводной воды; повторяют до тех пор, пока пленка не станет бледно-розовой;

7) наносят на препарат синьку Леффлера на 3–5 мин;

8) промывают водой;

9) препарат высушивают и микроскопируют под иммерсией при $\times 90$.

В правильно окрашенном препарате на чистом светлом фоне четко выделяются клетки микроорганизмов: кислотоустойчивые приобретают красный цвет, некислотоустойчивые — синий.

Выявление спорообразования лучше проводить у 2–3-суточной культуры исследуемого микроорганизма, так как за этот период времени гарантированно происходит развитие от вегетативной клетки до свободной споры. При обнаружении споры особое дифференциальное значение имеют размеры и форма споры, а также тип спорообразования (бациллярный, кластридиальный, плектридиальный) и расположение споры в клетке (центральное, эксцентральное или полярное).

Существует несколько методик обнаружения спорообразования.

Для обнаружения спор у живых микроорганизмов готовят препарат «висячая или раздавленная капля». С целью получить более четкий результат исследуемую культуру суспендируют в 7% -м водном растворе нигрозина. В светлом поле микроскопа споры видны как темные (за счет более высокого показателя преломления, чем у вегетативной клетки) образования округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры можно видеть как светлые образования на темных клетках.

Негативное окрашивание спор:

1) на препарат «мазок» наносят несколько капель метиленовой сини на 3–5 мин;

2) промывают, сушат и микроскопируют под иммерсией при $\times 90$, клетки окрашиваются в синий цвет, а споры, за счет меньшей проницаемости для красителя, остаются бесцветными.

Окраска спор по Пешкову:

1) на препарат «мазок» наносят синьку Леффлера, нагревают до кипения над пламенем горелки и выдерживают 10–20 с, добавляя краситель при необходимости;

2) охлаждают, промывают под слабой струей воды;

3) докрасивают 0,5% -м водным раствором нейтрального красного или сафранина, клетки окрашиваются в красный цвет, а споры — в синий.

Окраска спор по Шефферу — Фултону:

1) на препарат «мазок» кладут полоску фильтровальной бумаги, пропитанной 0,5% -м водным раствором малахитового зеленого;

2) помещают на 5 мин над кипящей водой;

3) промывают под слабой струей воды;

4) докрашивают сафранином в течение 30 с;

5) промывают, сушат и микроскопируют под иммерсией при $\times 90$, клетки окрашиваются в красно-коричневый цвет, а споры — в ярко-зеленый.

Важной особенностью **при обнаружении капсулы** является то, что она образуется в особых условиях культивирования и легко разрушается при высушивании и фиксации.

Окраска капсул по Дюгиду:

1) на подготовленное предметное стекло бактериологической петлей наносят несколько капель исследуемой суспензированной культуры и каплю черной туши;

2) накрывают покровным стеклом, прижимая с усилием и собирая излишки жидкости фильтровальной бумагой до появления тонкого коричневатого слоя жидкости между стеклами;

3) микроскопируют при $\times 90$ под иммерсией — на коричнево-черном фоне выделяются прозрачные капсулы вокруг преломляющих свет микроорганизмов.

Окраска капсул по Антони:

1) готовят препарат «мазок», но лишь высушивают при комнатной температуре, не фиксируя;

2) наносят несколько капель 1%-го водного раствора кристаллического фиолетового и окрашивают в течение 2 мин;

3) промывают 20%-м водным раствором сульфата меди, собирают остаток жидкости фильтровальной бумагой и сушат;

4) микроскопируют при $\times 90$ под иммерсией: капсулы выглядят светло-голубыми, а микроорганизмы — темно-фиолетовыми.

Окраска капсул по Гинсу:

1) на край подготовленного предметного стекла бактериологической петлей наносят несколько капель исследуемой суспензированной культуры, каплю черной туши и перемешивают;

2) ребром другого предметного стекла делают мазок аналогично приготовлению мазков крови — прижимая, проводят по всей поверхности первого стекла;

3) высушивают на воздухе и фиксируют 5–10 мин абсолютным метанолом;

4) затем наносят несколько капель водного раствора карболового фуксина Циля (1:3) и окрашивают 2–3 мин;

5) промывают под слабой струей воды и высушивают;

6) микроскопируют при $\times 90$ под иммерсией — на темно-сером фоне выделяются прозрачные капсулы вокруг розово-малиновых клеток микроорганизмов.

Обнаружение жгутиков и изучение их расположения является одним из важных дифференциально-диагностических методов и позволяет судить о наличии, способности и характере движения микроорганизма.

В связи с тем, что толщина бактериальных жгутиков составляет 10–30 нм, методики их обнаружения основаны на использовании протрав, которые осаждаются на жгутиках, тем самым увеличивая их толщину и делая возможным их наблюдение при световой микроскопии. Однако жгутики некоторых микроорганизмов возможно обнаружить фазовоконтрастным методом или в темном поле микроскопа. В любом случае необходима тщательная и аккуратная подготовка суспензии для исследования, так как жгутики легко обламываются даже при легком взбалтывании.

Окраска жгутиков по Фонтану:

1) исследуемую культуру культивируют на скошенном агаре в течение 12 ч;

2) перед приготовлением препарата пробирку с культурой выдерживают при комнатной температуре 1 ч;

3) осторожно касаются бактериологической петлей границы между скошенным агаром и конденсатом и помещают петлю на 1 ч в подготовленную пробирку с 0,5 мл дистиллированной воды;

4) петлю вынимают, прокаливают, охлаждают и переносят каплю взвеси на подготовленное предметное стекло;

5) помещают стекло с каплями в термостат;

6) после высыхания препарат фиксируют 5 мин жидкостью Руге;

7) промывают водой, заливают протравой и нагревают в течение 2 мин, отодвигая препарат в сторону при появлении паров и нагревая вновь;

8) охлаждают, промывают под слабой струей воды;

9) наносят на препарат несколько капель аммиачного раствора серебра и вновь аналогично прогревают в течение 2 мин;

- 10) промывают под слабой струей воды и высушивают;
- 11) микроскопируют при $\times 90$ под иммерсией: клетки микроорганизмов окрашиваются в черный или темно-коричневый цвет, а жгутики — в светло-коричневый или желтый.

Контрольные вопросы и задания

1. Каковы особенности строения прокариотной клетки?
2. Перечислите морфологические формы бактерий.
3. Что такое протопласты, сферопласты и L-формы бактерий?
4. Каковы особенности строения актиномицетов?
5. Каковы морфологические особенности риккетсий и микоплазм?
6. В чем особенности строения микроскопических грибов?
7. Чем обусловлены тинкториальные особенности грамположительных и грамотрицательных бактерий?
8. На каких особенностях кислотоустойчивых бактерий основан метод окраски по Цилю — Нильсену?

ГЛАВА 3. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов — раздел микробиологии, изучающий их химический состав, процессы питания, дыхания и размножения.

3.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ

3.1.1. БЕЛКИ

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

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

3.1.2. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Представляют собой высокомолекулярные биологические полимеры, построенные из мононуклеотидов. Для них характерно содержание фосфора (8–10%) и азота (15–16%), а также углерода, кислорода и водорода. Нуклеиновые кислоты в бактериальной клетке могут составлять от 10 до 30% сухого вещества в зависимости от вида бактерий и питательной среды. В большинстве своем они связаны с белками (нуклеопротеиды) и сложными радикалами клеточных структур бактерий. Нуклеиновые кислоты в микробных клетках представлены в виде рибонуклеиновой (РНК) и дезоксирибонуклеиновой (ДНК) кислот.

РНК преимущественно содержится в цитоплазме, в мельчайших ее зернышках — рибосомах, которые осуществляют синтез ферментов. ДНК находится в ядерном веществе бактерий. ДНК — материальный носитель наследственности всех организмов, в том числе микробов. В ее структуре закодирована генетическая информация биосинтеза белков.

3.1.3. УГЛЕВОДЫ

В бактериях углеводы составляют 12–18% от сухого вещества, это:

- многоатомные спирты (сорбит, маннит, дульцит);
- полисахариды (гексозы, пентозы, гликоген, декстрин);
- моносахариды (глюкозы, глюкуроновая кислота и др.).

Углеводы выполняют энергетическую роль в метаболических процессах микробной клетки.

3.1.4. ЛИПИДЫ И ЛИПОИДЫ

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

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

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

3.1.5. ВОДА

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

Какие химические элементы содержатся в микробной клетке? Ведущая роль принадлежит четырем органогенам — кислороду, водороду, углероду и азоту. Бактерии содержат по отношению к сухому веществу углерода — 45–55%, азота — 8–15, кислорода — 30, водорода 6–8%. Дрожжи: углерод — 49%, азот — 12, кислород — 31, водород — 6%. Микроскопические грибы: углерод — 47%, азот — 5, кислород — 40, водород — 6%.

3.1.6. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Кроме органогенов в микробных клетках находятся так называемые зольные элементы — минеральные вещества, составляющие от 3 до 10% сухого вещества. Среди них преимущественное значение имеет **фосфор**, который входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. **Сера** содержится в аминокислотах, в метионине, цистине, цистеине. **Магний** обеспечивает активность ряда ферментов, например протеазы. Микробы без магния не способны проявлять протеолитические свой-

ства. **Железо** необходимо для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. **Кальций, натрий, калий, кремний, хлор** тоже есть в микробных клетках. Наличие микроэлементов (**молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь, никель** и др.) в микробах обязательно; они стимулируют процессы роста и размножения.

3.2. ФЕРМЕНТЫ

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

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

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

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

Принято различать экзо- и эндоферменты. **Экзоферменты** не связаны со структурой протоплазмы, легко выделяются в субстрат (гидролитические ферменты), растворимы в питательной среде и проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты участвуют в основном в процессе питания: расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку

и др.), т. е. подготавливают питательные вещества к усвоению их микробной клеткой. **Эндоферменты** прочно связаны с бактериальной клеткой и действуют только внутриклеточно, осуществляя дальнейшее расщепление питательных веществ и превращение их в составные части клетки. К таким ферментам можно отнести, например, дегидрогеназы, оксидазы.

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

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

В настоящее время известно более 2000 ферментов, которые разделяются на шесть классов.

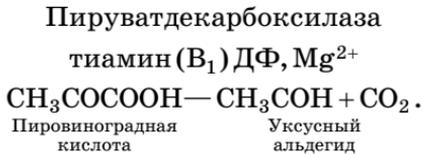
1. **Оксидоредуктазы** — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Они играют большую роль в процессах получения биологической энергии. К ним относятся дегидрогеназы (алкоголь: НАД-оксидоредуктаза, сукцинат — ФАД-оксидоредуктаза, аскорбинат — O_2 -оксидоредуктаза), каталаза, цитохромы, цитохромоксидазы.

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

3. **Гидролазы** — ферменты, катализирующие реакции гидролиза (расщепления) белков, жиров и углеводов с участием воды. Это протеолитические ферменты (или пептидгидролазы), действующие на белки или пептиды, аминолитические гидролазы глюкозидов, осуществляющие каталитическое расщепление углево-

дов и глюкозидов, липолитические экстеразы, катализирующие расщепление и синтез сложных эфиров (липазы, фосфатазы).

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



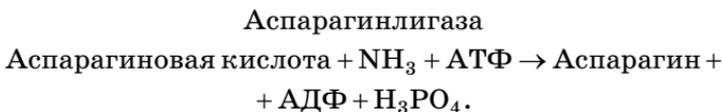
К лиазам принадлежит фермент фруктозодифосфатлиаза, или альдолаза, расщепляющий шестиуглеродную молекулу фруктозо-1,6-дифосфата на два трехуглеродных соединения. Альдолаза активно участвует в процессе обмена веществ.

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

6. **Лигаза (синтетаза)** — ферменты, катализирующие процессы синтеза связей за счет энергии распада АТФ:

образуют связи С-О; 6.2-С-S; 6.3-С-N; 6.4-С-С.

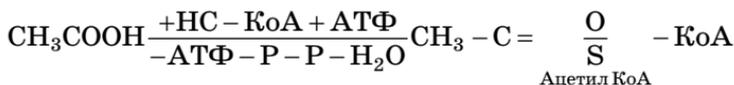
В результате образования связей из двух исходных молекул синтезируется новое органическое вещество. Например, аспарагинсинтетаза осуществляет синтез амида аспарагина из аспарагиновой кислоты и аммиака с образованием связи С-N с обязательным участием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), дающей энергию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



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

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

Ацетил КоА синтеза КФ 6.2.1.1



HS-КоА — это небелковая часть (кофермент) фермента ацетилирования.

По современной классификации каждому ферменту присвоен шифр из четырех цифр: первая обозначает класс, вторая — подкласс, третья — подподкласс и четвертая — порядковый номер фермента в данном подподклассе. Так шифр КФ 3.5.1.5 принадлежит карбамидамидогидролазе (уреазе), которую относят к третьему главному классу — гидролазам. Шифр ацетил КоА синтетазы — КФ 2.1.1, то есть данный фермент относится к шестому классу лигаз, ко второму подклассу (образование С-связи) и к первому подподклассу (место образования связи в карбоксильной группе), последняя цифра — порядковый номер фермента.

Скорость реакций, катализируемых ферментами, различна и зависит от количества и активности ферментов, концентрации субстрата, рН, температуры, присутствия в среде активаторов и ингибиторов. Активность измеряют в международных единицах (МЕ); 1 МЕ соответствует количеству фермента, превращающему 1 мкМ (микромоль) (мг/М; 10^{-6} М) субстрата в 1 мин в стандартных условиях.

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

3.3. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Разные виды бактерий имеют различный набор ферментов. Это обстоятельство послужило основой включения ферментативных свойств бактерий в группу признаков для их идентификации.

В зависимости от субстрата, который расщепляют бактерии, ферментативные свойства условно подразделяются на: сахаролитические, протеолитические, гемолитические, восстанавливающие свойства, каталазную активность и др.

3.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Чистую культуру бактерий засевают на дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят различные углеводы и индикаторы.

В зависимости от изучаемого рода и вида бактерий избирают среды с соответствующими моно- и дисахаридами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген, инсулин и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.). В процессе ферментации бактерии образуют конечные продукты: альдегиды, кислоты и газообразные продукты (CO_2 , H_2 , CH_4).

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

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

В жидких питательных средах изменения устанавливают также по изменению цвета индикатора, а образование газа — с помощью поплавка (небольшая пробирка помещается вверх дном), в котором появляется пузырек газа.

При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, то наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым» рядом.

Для разовой дифференциации микроорганизмов семейства энтеробактерий широко используется их способность расщеплять различные углеводы с образованием кислоты и газа.

На **плотных дифференциально-диагностических средах**, в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску. Например, кишечная палочка, ферментирующая лактозу, на среде Эндо образует ярко-красные колонии; сальмонеллы, не ферментирующие лактозу, на этой среде образуют бесцветные или слегка розоватые колонии.

3.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Наиболее часто для обнаружения протеолитических ферментов производят посев чистой культуры бактерий уколом в столбик мясопептонного желатина. Посевы выдерживают при комнатной температуре (20–22°C) в течение нескольких дней, при этом регистрируют не только наличие разжижения, но и его характер.

Разжижение может быть послойное, что характерно для синегнойных бактерий, для стафилококков — в виде «чулка». Характер разжижения желатина возбудителем сибирской язвы напоминает перевернутую ель.

Протеолитическое действие микроорганизмов можно наблюдать при посевах на свернутую сыворотку крови — вокруг колоний появляются углубления и зоны разжижения.

В молоке наблюдается просветление или растворение образовавшегося вначале сгустка казеина, который расщепляется с образованием пептона, что придает молоку желтоватый цвет (пептонизация молока).

Показателями более глубокого расщепления белка являются его конечные продукты: индол, аммиак, сероводород и др. Для определения этих газообразных веществ производят посев чистой культуры бактерий в бульон или пептонную воду. В пробирки с засеянной средой между стенкой пробирки и пробкой помещают индикаторную бумагу. Посевы выращивают в термостате в течение 1–3 сут.

Обнаружение индола производится несколькими методами. Наиболее прост и доступен способ Мореля. Узкие полоски фильтровальной бумаги смачивают горячим насыщенным раствором

щавелевой кислоты (индикаторная бумага) и высушивают. При выделении индола на 1–3-й день нижняя часть полоски бумаги вследствие соединения индола с щавелевой кислотой приобретает розовый цвет.

Наличие аммиака определяют по посинению розовой лакмусовой бумаги, помещенной в пробирку таким же образом, как и для определения индола.

Обнаружение сероводорода. В пробирку с посевом помещают индикаторную полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца. При взаимодействии сероводорода и уксуснокислого свинца бумага чернеет за счет образования сернистого свинца.

3.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДУЦИРУЮЩЕЙ (ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ) СПОСОБНОСТИ

Для этой цели используют метиленовую синь, тионин, лакмус, нейтральный красный и др. К МПА и МПБ прибавляют раствор одного из указанных красителей. При наличии у бактерий редуцирующей способности среда Ротбергера (МПА с 1%-ым раствором глюкозы и несколькими каплями насыщенного раствора нейтрального красного). При положительной реакции красный цвет среды переходит в желтый.

3.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА КАТАЛАЗЫ

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

3.3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМОКОАГУЛЯЦИИ

Это одна из наиболее надежных проб для выявления патогенности стафилококков. Для ее постановки разливают по 1–2 мл стерильной плазмы, вносят бактериологической петлей культуру

бактерии и помещают в термостат. Проверяют результаты через 30 мин, 2, 4 ч и на следующий день. При положительной реакции происходит коагуляция (свертывание плазмы).

3.3.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-АЗЫ

К расплавленному МПА добавляют навеску ДНК из расчета 2 мг на 1 мл среды. Посевы проводят в виде полоски и помещают в термостат на 18–24 ч. На выросший стафилококк наливают 5–6 мл н. НС1. Присутствие в культуре фермента, расщепляющего ДНК, выявляется образованием прозрачных зон вокруг колоний стафилококка.

3.4. МЕТАБОЛИЗМ

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

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

3.5. ПИТАНИЕ

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

Различают несколько механизмов питания микробных клеток. Питательные вещества могут поступать из окружающей среды в микробную клетку через клеточную стенку, капсулу, слизистые слои и цитоплазматическую мембрану. Через эти же структуры выделяются и продукты обмена, то есть ненужные и вредные для микроорганизмов вещества. В основе механизма такого питания лежит **осмотическое давление**, основанное на разнице концентрации питательных веществ в теле микроба и питательном растворе. Таким образом, вода и растворенные в ней питательные вещества поступают в микробную клетку. В результате биосинтеза в ней накапливается пластический материал коллоидной структуры (белки, углеводы и другие вещества), обуславливающий рост и размножение микроорганизма.

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

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

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

Если бактерию поместить в 15–20% -й раствор хлорида натрия или сахара (гипертонический раствор), то наступает резкое обезвоживание бактериальной клетки и протоплазматическое ее содержание отходит от оболочки. Такое явление носит

название **плазмолиза**. Морфологически плазмолиз характеризуется возникновением шарообразных светопреломляющих образований в теле клетки. У различных микроорганизмов плазмолиз проявляется не в одинаковой степени. К нему особенно устойчивы сенная бацилла, стафилококки, сарцины; легко подвергаются плазмолизу бактерии из группы пастерелл, эшерихий, сибиреязвенная бацилла, холерный вибрион и др.

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

3.5.1. ТИПЫ ПИТАНИЯ МИКРОБОВ

Различают **углеродное** и **азотное** питание микроорганизмов. По типу углеродного питания микробы принято делить на аутотрофы и гетеротрофы.

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

типа хлорофилла — бактериопурпурин, при помощи которого и используют световую энергию (фотосинтез) для построения органических веществ своего тела из угольной кислоты и неорганических солей.

Гетеротрофы (от *греч.* heteros — другой) в противоположность аутотрофным микробам используют углерод из любых готовых органических соединений. К гетеротрофам принадлежат возбудители различного рода брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза; патогенные стафилококки; стрептококки; диплококки и возбудители ряда других инфекций.

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

Гетеротрофы включают две подгруппы: метатрофные и паратрофные микроорганизмы. **Метатрофы**, или **сапрофиты**, живут за счет использования мертвых субстратов. Сапрофиты — гнилостные микробы. **Паратрофы** — паразиты, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

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

Основным источником азотного питания у аутотрофов служат неорганические соединения азота, то есть соли азота,

а у гетеротрофов — аминокислоты, которые они используют из белков животного организма, если в нем паразитируют, или получают их готовыми из питательных сред.

По способу усвоения азотистых веществ микробов подразделяют на четыре группы:

1) протеолитические, способные расщеплять нативные белки, пептиды и аминокислоты;

2) дезаминирующие, способные отщеплять аминогруппы только у свободных аминокислот;

3) нитритно-нитратные, усваивающие окисленные формы азота;

4) азотфиксирующие, обладающие свойством питаться атмосферным азотом.

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

Жизненно необходимые элементы — калий, магний и железо — микроорганизмы получают из различных солей. Железо входит в состав гемина (особая органическая группа цитоплазмы) и служит катализатором окислительных реакций. Калий — обязательный элемент в питательной среде, но физиологическое значение его еще полностью не выяснено. Роль кальция в жизни бактерий (за исключением бактерий, участвующих в фиксации азота из воздуха), по-видимому, невелика. Магний активирует различные ферменты бактерий, в частности протеазу.

Микроэлементы — бор, цинк, марганец, кобальт и другие — встречаются в бактериях в ничтожных количествах и служат стимуляторами роста микробов.

3.5.2. ФАКТОРЫ РОСТА МИКРОБОВ

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

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

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

Некоторые микроорганизмы в качестве фактора роста используют аминокислоты, синтезируемые самой микробной клеткой или находящиеся в среде.

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

Организмы, способные использовать в качестве источника энергии для роста свет, называют **фототрофными**. Организмы,

получающие энергию в результате окислительно-восстановительных реакций с участием субстратов, которые служат для них источником питания, называют **хемотрофными**.

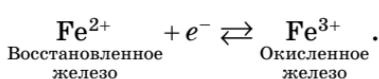
Все организмы, использующие в качестве доноров водорода органические соединения, называют **органотрофными**, а организмы, способные использовать неорганические доноры электронов, — **литотрофными**.

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

3.6. ДЫХАНИЕ

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

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



Перенос электрона всегда сопровождается высвобождением энергии, которая немедленно утилизируется клеткой с помощью аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ). Здесь она накапливается и расходуется в результате жизнедеятельности микробной клеткой.

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

Совокупность окислительно-восстановительных ферментных реакций, осуществляющих последовательный перенос во-

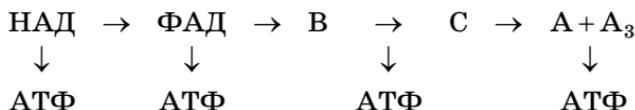
Как видно на схеме, НАД-зависимая ДГ катализирует процесс отщепления и переноса протонов (2H^+) и электронов ($2e^-$) от субстратов, содержащих спиртовую группу ОН (лимонная, изолимонная, молочная, пировиноградная и другие кислоты), в результате НАД окисленный превращается в НАД- H_2 восстановленный. Атом водорода (протоны и электроны) НАД- H_2 переносятся ФАД-зависимой ДГ. При окислении янтарной кислоты в фумаровую, высших жирных кислот (ВЖК), аминокислот, в молекуле которых отсутствует спиртовая группа ОН $\text{A}-\text{C}-\text{H}_2-\text{CH}_2-$, флавиновые ферменты могут играть роль первичных ДГ, то есть прямо без участия НАД- или НАДФ-зависимых дегидрогеназ принимать электроны и протоны от окисляемых продуктов и превращаться в ФАД- H_2 -ДГ.

Следующим акцептором H_2 дыхательной цепи является убинохин, или кофермент Q (КоQ). Восстановленный КоQ- H_2 отдает ионы водорода 2H^+ в окружающую среду (в раствор клетки), а электрон переходит на цитохром и присоединяется к иону железа:



Далее электроны от цитохрома В переходят на цитохром C_1 , затем на цитохром С и на цитохромоксидазу А + A_3 . С цитохромоксидаз электрон переносится на кислород и превращает его в активную форму. Активный кислород восстанавливается активным водородом до H_2O в 90% случаев или до пероксида водорода в 10% случаев. Пероксид водорода — сильнейший яд; разрушается ферментами каталазой или пероксидазой.

При восстановлении одного атома кислорода активным водородом до H_2O образуется три молекулы АТФ — аденозинтрифосфорной кислоты:



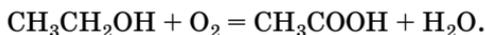
3.6.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

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

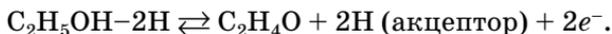
Прямое окисление осуществляется с помощью оксидаз путем непосредственного окисления вещества кислородом воздуха. Прямое окисление присуще большинству сапрофитных микроорганизмов. Например, бактерия метаникум, окисляя метан, получает энергию по следующей схеме:



У некоторых микробов, поглощающих кислород, реакции окисления являются неполными, то есть не завершаются получением конечного продукта — углекислоты. Примером такого неполного окислительного процесса служит дыхание уксуснокислых бактерий, у которых конечным продуктом окисления этилового спирта является не углекислота, а уксусная кислота:

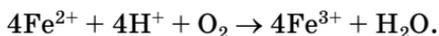


Непрямое окисление представляет собой реакцию дегидрогенирования и сопровождается одновременным переносом двух электронов, причем от субстрата отщепляются два протона (H^+). При ферментативном отщеплении водорода субстрата при помощи дегидрогеназ освобождаются два электрона (энергия) подобно образованию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

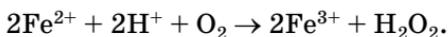


Дегидрогеназ у бактерий несколько, они называются по донору водорода (например, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа), но большинство их переносит водород на один из двух коферментов — никотинамидадениндинуклеотид (НАД^+) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ^+). Оба кофермента легко отделяются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

Аэробное дегидрогенирование происходит в присутствии кислорода и у таких микробов, как, например бациллы. Акцептором водорода является кислород, в результате (в зависимости от набора ферментов) образуется вода или пероксид водорода. Для их целей у аэробных бактерий служат цитохромоксидаза и система геминовых ферментов-цитохромов. Цитохромоксидаза катализирует конечное связывание водорода с атмосферным кислородом вне клетки. Если она переносит две пары водородных ионов, образуется вода:



Если она связывает с кислородом воздуха только одну пару водородных ионов, то конечный продукт — пероксид водорода:



Поскольку пероксид водорода токсичен для бактерий, он моментально разлагается каталазой или пероксидазой. облигатные анаэробы каталазу не содержат, чем частично можно объяснить токсичность для них кислорода.

Анаэробное дегидрогенирование осуществляется при отсутствии молекулярного кислорода. Акцепторами водорода служат другие неорганические элементы, например, соли азотной, серной кислот, уголекислоты, которые превращаются при этом в более восстановленные соединения (аммиак, метан, сероводород).

Свойство анаэробов переносить электроны на нитраты, сульфаты и карбонаты обеспечивает в достаточной степени полное окисление органического или неорганического вещества без использования молекулярного кислорода и обуславливает возможность получения ими большего количества энергии, чем при процессе брожения. При анаэробном дыхании выход энергии только на 10% ниже, чем при аэробном. Микроорганизмы, для которых характерно анаэробное дыхание, имеют набор ферментов цепи переноса электронов, но цитохромоксидаза у них заменяется нитратредуктазой (в случае использования нитратов) или аденилсульфатредуктазой (в случае использования сульфатов).

3.6.2. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

При изготовлении питательных сред учитывают не только рН среды, но и соотношение веществ, отдающих и принимающих электроны. Величину окислительно-восстановительного потенциала обозначают символом rH_2 — отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Он измеряется потенциометром или на универсальном ионметре в mV и обозначается в единицах, диапазон rH_2 от 0 до 42,6 характеризует все степени насыщения раствора H и O_2 . Так, строгие анаэробы растут при низком окислительно-восстановительном потенциале — от 0 до 12, факультативные микроорганизмы — от 0 до 20 и аэробы — от 14 до 35. Следовательно, он минимален при насыщении кислородом. Регулируя степень окислительно-восстановительного потенциала, мы создаем благоприятные условия для роста и размножения микроорганизмов.

3.6.3. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ АНАЭРОБИОЗА

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

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

Химический метод предполагает применение поглотителей кислорода, например пирогаллола с гидроокисью натрия, калия либо гидросульфита натрия с гидрокарбонатом натрия в соотношении 1:1.

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

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

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

3.7. РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

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

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение) в различных плоскостях: новые клетки располагаются в виде кисти винограда — стафилококки, цепочки — стрептококки, соединения по парам — диплококки, пакетов — сарцины и др. Процесс деления состоит из ряда последовательных этапов. Первый этап начинается формированием в средней части клетки поперечной перегородки (рис. 8), состоящей вначале из цитоплазматической мембраны, которая делит цитоплазму материнской клетки на две дочерние. Параллельно синтезируется клеточная стенка, образующая полноценную перегородку между ними.

В процессе деления бактерий важным условием является репликация (удвоение) ДНК, которая осуществляется ферментами ДНК-полимеразами. При удвоении ДНК проис-



Рис. 8
Процесс формирования
перетяжки делящейся клетки
Brucella melitensis $\times 120\,000$

ходит разрыв водородных связей и образование двух спиралей ДНК, каждая из которых находится в дочерних клетках. Далее дочерние односпиральные ДНК восстанавливают водородные связи и вновь образуют двуспиральные ДНК.

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

Типы деления клеток бактерий:

- клеточное деление опережает разделение, что приводит к образованию «многоклеточных» палочек и кокков;
- синхронное клеточное деление, при котором разделение и деление нуклеоида сопровождаются образованием одноклеточных организмов;
- деление нуклеоида опережает клеточное деление, обуславливая образование многоклеточных бактерий.

Разделение бактерий, в свою очередь, происходит тремя способами:

- разламывающее разделение, когда две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают цитоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга, при этом формируются цепочки (сибиреязвенные бациллы);
- скользящее разделение, при котором после деления клетки обособляются и одна из них скользит по поверхности другой (отдельные разновидности эшерихий);
- секущее разделение, когда одна из разделившихся клеток свободным концом описывает дугу круга, центром которого служит точка ее контакта с другой клеткой, образуя римскую пятерку или клинопись (коринебактерии дифтерии, листерии).

3.7.1. ФАЗЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

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

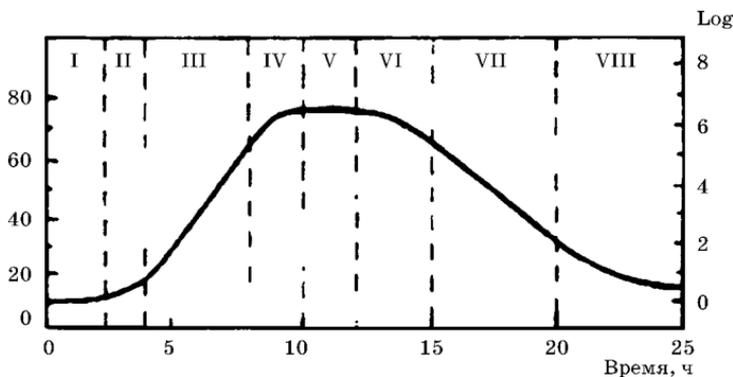


Рис. 9
Кривая размножения бактерий

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции представляют графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени. Типичная кривая роста имеет S-образную форму (рис. 9) и позволяет различать несколько фаз, следующих в определенной последовательности.

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

II. Фаза задержки размножения. В этот период бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Продолжительность — около 2 ч и зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспосабливаются быстрее, чем старые), биологических особенностей микробных клеток (для кишечных бактерий характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза — длительный), полноценности питательной среды, температуры выращивания, концентрации CO_2 , pH, степени аэрации среды, окислительно-восстановительного потенциала.

Нередко обе фазы объединяют термином «лаг-фаза» (от *англ.* lag — отставание, запаздывание).

III. Логарифмическая фаза. В этот период скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции макси-

мальны. Это период генерации (от *лат.* *generatio* — рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, постоянное для данного вида, а количество бактерий удваивается в геометрической прогрессии: в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй — обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из полученных четырех формируются восемь и т. д. Следовательно, после генераций количество клеток в культуре будет равно $2n$. Продолжительность — 5–6 ч.

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

V. Стационарная фаза максимума. Число новых бактерий почти равно числу отмерших, то есть наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжительность — 2 ч.

VI. Фаза ускорения гибели. Прогрессивное превосходство числа погибших клеток над числом вновь нарождающихся. Продолжительность — около 3 ч.

VII. Фаза логарифмической гибели. Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью. Продолжительность — около 5 ч.

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

3.8. РАЗМНОЖЕНИЕ ГРИБОВ И ДРОЖЖЕЙ

У грибов различают три типа размножения: вегетативное бесполое и половое. При **вегетативном** размножении происходит отделение от мицелия его частей, которые, развиваясь, образуют новую грибницу. Кроме того, мицелий может фрагментироваться на артрспоры (оидии) и хламидоспоры. Артрспоры — короткие овальные клетки, образующиеся при распаде гиф, каждая из которых дает начало новой клетке. Хламидоспоры — споры вегетативного размножения грибов,

покрытые толстой темноокрашенной оболочкой; образуются при распаде гиф на отдельные клетки. Этот тип размножения также может осуществляться путем почкования мицелл или отдельных клеток, например, у дрожжевых грибов.

Наиболее распространено **бесполое** размножение при помощи спор. Созревшие конидии у грибов осыпаются; при созревании спорангиоспор спорангии лопаются и споры из них высыпаются. Попадая в благоприятные условия, споры прорастают в гифы.

При **половом** размножении грибов спорообразованию предшествует слияние гаплоидных мужских и женских гамет, в результате чего возникает зигота и наступает диплоидная фаза с полным (парным) набором хромосом. Половой процесс у разных групп грибов протекает различно и имеет свои особенности.

Дрожжи — **гетеротрофы с окислительным или бройдильным типом метаболизма**. Наиболее распространенный способ **вегетативного** размножения дрожжей — почкование. Реже дрожжи размножаются делением. При **половом** размножении после коопуляции двух клеток и при слиянии ядер зигота превращается в аску, диплоидное ядро делится 2–3 раза и образуется четыре или восемь аскоспор, каждая из которых может прорастать в новую клетку.

3.9. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

В лабораторных условиях микроорганизмы выращивают на питательных средах, которые должны быть стерильными, прозрачными, содержать определенные питательные вещества (белки, углеводы, витамины, микроэлементы и др.), обладать определенной буферностью, иметь соответствующий рН, окислительно-восстановительный потенциал. Питательные среды классифицируют:

- по консистенции — жидкие, полужидкие, плотные (твердые);
- по происхождению — животные, растительные, синтетические (приготовлены из определенных химически чистых соединений в точно указанных концентрациях);
- по назначению — общеупотребительные (универсальные), дифференциальные, селективные и среды обогащения, специальные.

Обычные (простые) среды пригодны для культивирования многих видов патогенных и непатогенных бактерий. К ним относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный желатин (МПЖ). Мясопептонный агар готовят из мясопептонного бульона путем добавления 1–2% агар-агара, который придает питательной среде при охлаждении консистенцию плотного студня. Получают агар из некоторых видов водорослей.

Дифференциальные среды служат для идентификации бактерий разных видов и родов по их культуральным и биохимическим свойствам. К ним относят мясопептонный желатин, среды Гисса, Эндо, кровяной агар, бактоагар Плоскирева (бактоагар Ж) и др.

Элективные (избирательные) среды и среды обогащения благоприятствуют размножению бактерий определенных видов и подавляют рост других микробов. К ним относят яичные среды Петраньяни, Гельберга для выращивания микобактерий туберкулеза, среды Дюба — Смита в модификации А. П. Аликаевой для выращивания возбудителя паратуберкулеза и др.

Специальные среды — наиболее оптимальные для выращивания бактерий, не размножающихся на общепотребительных средах. К ним относят кровяной агар, сывороточный агар, сывороточный бульон, среду Китта — Тароцци (МППБ), среду Сабуро и др.

На плотных питательных средах микробы образуют различные по форме и величине колонии, которые представляют собой видимые скопления особей одного вида микроорганизмов в результате размножения из одной или нескольких клеток.

Колонии характеризуют следующие параметры:

- размер — крупные (до 4 мм), средние (2–4 мм), мелкие (1–2 мм);
- форма — круглая, эллипсоидная, ветвистая (изменяется в зависимости от условий питания и других влияний окружающей среды);
- поверхность — блестящая, матовая, неровная, морщинистая, складчатая, гладкая, исчерченная;
- прозрачность — прозрачные, мутные, опалесцирующие;
- консистенция — слизистая, вязкая, сухая, крошковидная;

- края — ровные, неровные, изрезанные, бахромчатые, зубчатые, локонообразные, изъеденные, расплывчатые;
- профиль или рельеф — плоский, приподнятый, выпуклый, вдавленный, куполообразный;
- структура — однородные (гомогенные), зернистые;
- пигмент — белый, серо-белый, золотистый, красный.

Изучение колоний ведут визуально (размер, форма, цвет, прозрачность) с помощью лупы и микроскопа под малым увеличением (строение и края колонии).

У культур, выращенных в жидких питательных средах, обращают внимание на: поверхностный рост (пристеночное кольцо, хлопья, их характер); помутнение — слабое, умеренное, сильное; осадок — плотный, хлопьевидный, зернистый, в виде клочка ваты; количество его — обильное, скудное; цвет культуры и запах.

3.9.1. ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Спирохеты и простейшие культивируют на питательных средах, содержащих нативные белки (сыворотка, кровь), кусочки свежих органов и тканей (почки кролика, печень, мозговая ткань), а также синтетических питательных средах из определенных аминокислот, минеральных веществ.

Риккетсии (облигатные внутриклеточные паразиты) размножаются в клетках с пониженным метаболизмом. Их культивируют в куриных эмбрионах, на культуре клеток и ткани, а также в организме животных.

Патогенные грибы, как правило, культивируют на селективных средах слабокислой или кислой реакции (рН 6,8–4,5). Селективность достигается подбором питательных веществ и добавлением антибиотиков или красителей для подавления роста бактериальной флоры. Оптимальная температура культивирования — 25–28°C. Широко используют плотные среды Сабуро, пивное сусло-агар и др. Из жидких средств хорошо зарекомендовали себя сахарный бульон, пивное сусло, среда Чапека — Докса, рН 6,0–6,4.

Микоплазмы в силу своих структурных особенностей плохо адаптируются на питательных средах. Одни штаммы вызывают помутнение среды, другие — образуют легкую пленку;

некоторые — растут в верхнем слое питательной среды, прочие — в придонной части. На плотных питательных средах микоплазмы формируют характерные колонии, напоминающие яичницу-глазунью. При этом рост первичных посевов начинается на 3–7-е сутки, адаптированные же штаммы растут значительно быстрее.

3.10. СИНТЕЗ МИКРОБНЫХ ПИГМЕНТОВ, ФОСФОРЕСЦИРУЮЩИХ И АРОМАТОБРАЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности синтезируют красящие вещества — пигменты, придающие колониям бактериальных культур разнообразный цвет и оттенки, что учитывают при дифференциации микроорганизмов. Различают красные пигменты, желтые или оранжевые (микобактерии туберкулеза, сарцины, стафилококки), сине-зеленого цвета (синегнойная палочка, бактерия синего молока), фиолетовые, черные (некоторые виды грибов, дрожжей, актиномицетов).

Образование пигментов происходит в присутствии кислорода при комнатной температуре и освещении. Микроорганизмы, развиваясь на пищевых продуктах (молоко, сыр, мясо, рыба, масло, творог), изменяют их цвет.

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

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

Светящиеся микроорганизмы (фотобактерии). Вследствие окислительных процессов в бактериальной клетке обладают способностью свечения (люминесценции). Фотобактерии —

строгие аэробы, при прекращении доступа кислорода свечение у них приостанавливается. Наблюдаемое в природе свечение гнилушек, старых деревьев, мяса, чешуи рыбы, термитов, муравьев, пауков, других предметов и объектов обусловлено наличием в них фотобактерий. Среди них встречаются кокки, вибрионы, некоторые грибы и бактерии. Они хорошо развиваются на обычных питательных средах, на рыбных и мясных субстратах при 15–37°C. Типичным представителем фотобактерий является *Photobacterium phosphoreum*. Патогенных фотобактерий не установлено.

Ароматобразующие микроорганизмы обладают способностью вырабатывать ароматические вещества, например уксусно-этиловый и уксусно-амиловый эфиры, которые придают ароматические свойства винам, пиву, кисломолочным продуктам, селю, почве и т. д. Типичным представителем ароматобразующих бактерий является *Leuconostoc cremoris*, который широко используют при изготовлении кисломолочных продуктов.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие минеральные вещества входят в состав микроорганизмов?
2. Что представляют собой ферменты микробных клеток и какое участие они принимают в жизнедеятельности клетки?
3. Назовите гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты.
4. Назовите типы питания микробов и раскройте их сущность.
5. На чем основана классификация микробов по типу дыхания?
6. Сформулируйте понятие о факультативных анаэробах, микроаэрофилах, анаэробах, аэробах.
7. Перечислите способы размножения микроорганизмов.
8. Каковы основные принципы культивирования микроорганизмов?
9. Какие методы создания анаэробноза вы знаете?

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетика — наука о наследственности и изменчивости организмов, она изучает и анализирует законы передачи наследственных признаков от поколения к поколению, а также механизмы, обеспечивающие наследование на всех уровнях организации живых существ (особь, клетка).

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

4.1. МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Основная генетическая структура прокариотной клетки — это хромосома, представляющая собой громадную молекулу ДНК в виде двойной спирали, замкнутой в кольцо. Она является носителем генетической информации и называется **геномом**. Молекула состоит из функционально неоднородных генетических детерминант — **генов**, которые располагаются линейно вдоль хромосомы. Схема, отражающая расположение генов на хромосоме, называется **генетической картой**. Функциональная единица наследственности — ген. Все свойства организма однозначно определены его генами. Каждый ген может существовать в виде ряда структурных форм, или **аллелей**.

Совокупность аллелей всех генов клетки составляет ее **генотип**. В генах записана информация относительно всех свойств, присущих клетке. Гены определяют особенности клеточных компонентов, их структуру и функцию.

Каждый ген представляет собой определенный участок молекулы ДНК. Специфическая информация, содержащаяся в гене, определена последовательностью оснований в цепи ДНК. «Алфавит», с помощью которого записана эта информация ДНК, включает четыре «буквы» основания: аденин (А), гуанин (G), тимин (Т) и цитозин (С). В мРНК вместо тимина урацил (U).

Бактерии, как и все прокариоты, гаплоидны, то есть генетический материал у них представлен одним набором генов.

4.1.1. СИНТЕЗ БЕЛКА

Возникает вопрос: каким же образом сохраняется наследственная информация при росте и размножении клеток? Перед делением клетки происходит идентичная редупликация, или репликация генов. Этот процесс объясняют на основании модели структуры ДНК, предложенной Уотсоном и Криком, из механизма удвоения ДНК (рис. 10).

Две цепи двойной спирали ДНК комплементарны друг другу. На каждой цепи из структурных элементов ДНК — дезоксирибонуклеозидтрифосфатов — синтезируется новая цепь; при этом с каждым из оснований спаривается комплементар-

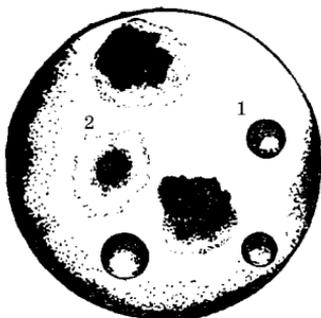


Рис. 10
Структура
дезоксирибонуклеиновой
кислоты (ДНК):

1 — S-форма колоний; 2 — R-форма колоний.

ное ему основание, так что каждая из двух новых цепей опять-таки будет комплементарна родительской цепи. Обе новые двойные спирали состоят из одной родительской и одной вновь синтезированной цепи. Эта точная репликация ДНК гарантирует сохранение генетической информации. ДНК, будучи носителем наследственной информации, тем не менее сама не служит матрицей для синтеза полипептидов. Биосинтез белков происходит на рибосомах, которые непосредственно с ДНК не соприкасаются (рис. 11).

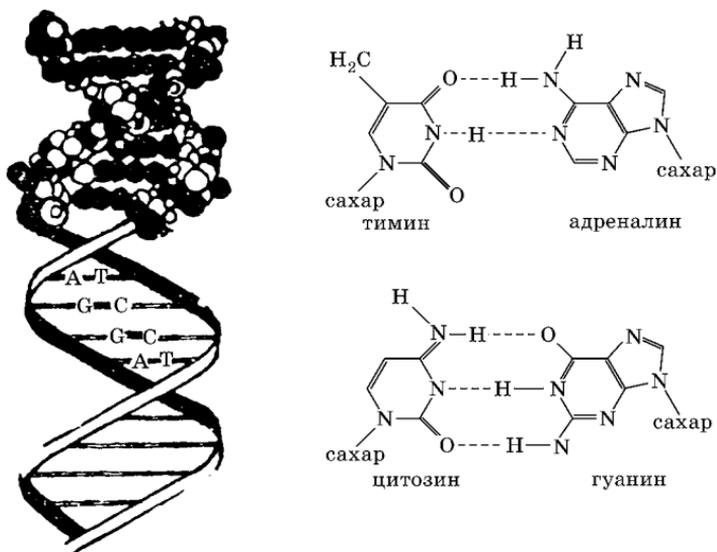


Рис. 11
Схема биосинтеза белка в клетке

Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет матричная, или информационная, рибонуклеиновая кислота (мРНК или иРНК). Она состоит из одной цепи и очень напоминает одиночную цепь ДНК с тем отличием, что тимин ДНК в РНК заменен урацилом. На одной из цепей ДНК синтезируется мРНК, причем механизм этого процесса сходен с механизмом репликации ДНК. Таким образом, при синтезе мРНК просто копируется нуклеотидная последовательность ДНК. Этот процесс называют транскрипцией (переписыванием).

Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, обусловлена последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Каждая аминокислота определяется группой из трех соединений нуклеотидов — триплетом, или кодоном.

Аминокислоты соединяются в полипептидную цепь в порядке, определяемом триплетами мРНК. В этом процессе участвуют мРНК, транспортные РНК (тРНК), рибосомы, ряд ферментов и другие факторы. Соединение аминокислот происходит на рибосомах. К мРНК обычно присоединяется несколько

рибосом, так что на одной и той же матрице одновременно синтезируется несколько полипептидных цепей. Такой комплекс одной мРНК с рибосомами называется **полисомами**. В результате нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой закодированную «инструкцию», определяющую (при посредстве мРНК) структуру специфического белка. Таким образом, процесс биосинтеза белка происходит в два этапа: первый — транскрипция — переписывание информации с ДНК на мРНК; второй — трансляция — реализация этой информации в рибосомах, образование белковой молекулы.

4.2. НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Наследственность неразрывно связана с другими свойствами и изменчивостью, то есть изменением специфических свойств под действием различных факторов. Учение о наследственности и изменчивости организмов было создано в 1859 г. Ч. Дарвином, который доказал, что все существующие на земле виды животных и растений произошли путем изменчивости из немногих форм или какой-нибудь одной формы. Эволюция по Дарвину идет путем естественного отбора ненаправленных случайных изменений.

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

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

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

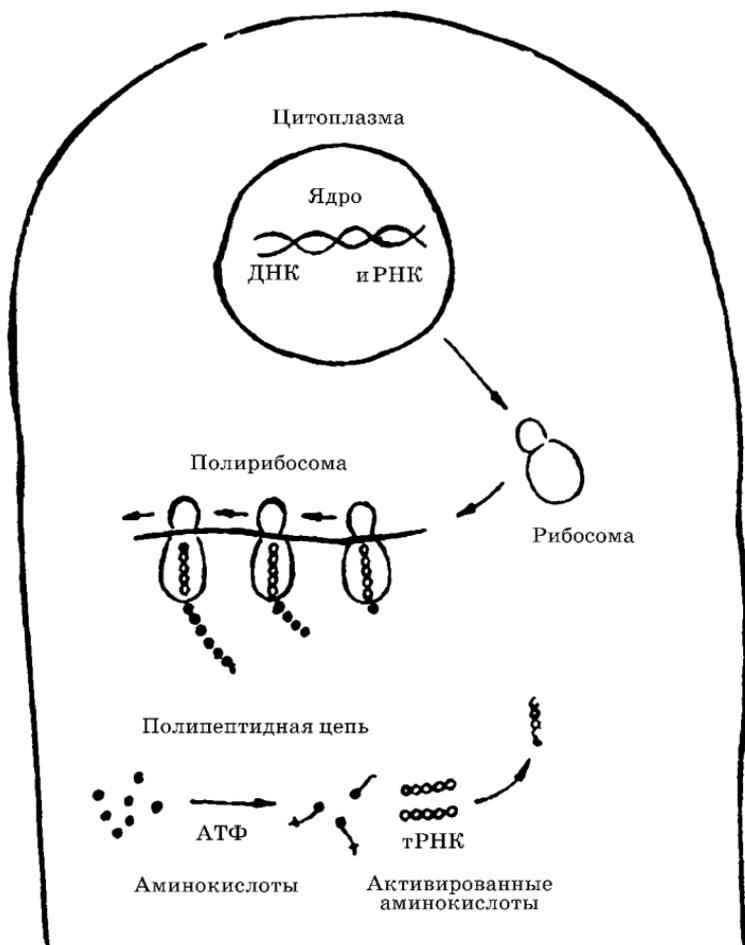


Рис. 12
Диссоциация микроорганизмов:

физм (многообразие), обусловленный влиянием накопившихся в ней продуктов жизнедеятельности.

Культуральная изменчивость. Одна из форм культуральной изменчивости — феномен диссоциации, то есть разъединение популяции бактерий и возникновение S- и R-форм. При посеве на пластинки МПА в чашках Петри чистой культуры микроорганизма образуются колонии двух основных типов (рис. 12).

Между этими формами существуют переходные М- и О-формы (слизистая и переходная).

Свойства клеток колоний S- и R-форм:

1) S-форма:

- колонии прозрачные, с гладкой блестящей поверхностью, круглые, с ровными краями, выпуклые;
- подвижные виды имеют жгутики;
- у капсульных видов хорошо видна капсула или слизистый слой;
- биохимически более активны;
- у патогенных видов выражены вирулентные свойства;
- полноценны в антигенном отношении;
- чувствительны к фагу;
- взвесь клеток в физиологическом растворе гомогенная, стойкая, нормальных размеров;

2) R-форма:

- колонии шероховатые, непрозрачные, с неровными краями, часто морщинистые;
- жгутики часто отсутствуют;
- капсулы или слизистый слой отсутствуют;
- биохимически менее активны;
- слабовирулентные или авирулентные;
- неполноценны в антигенном отношении;
- слабочувствительны к фагу;
- взвесь быстро оседает, осадок крошковидный, клетки полиморфные.

Отметим, что бактерии в R-форме способны утратить специфическую агглютинабельность, что значительно затрудняет идентификацию выделенных культур. Для абсолютного большинства патогенных микробов S-форма колоний является нормой. Однако у некоторых патогенных микробов при шероховатой форме колоний сохраняются вирулентные свойства.

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

Изменчивость ферментативных (биохимических) свойств. Бактерии каждого вида имеют определенный набор ферментов, благодаря которым усваивают различные питательные веще-

ства. Эти ферменты вырабатываются на определенных питательных субстратах и предопределены генотипом. В процессе жизнедеятельности бактерий обычно функционируют не все гены, ответственные за синтез соответствующих ферментов. В геноме бактерий всегда есть запасные возможности, т. е. гены, определяющие выработку адаптивных ферментов. Например, кишечная палочка, растущая на среде без углевода лактозы, не синтезирует фермент лактозу, но если пересеять культуру на среду с лактозой, то она начнет вырабатывать этот фермент. Адаптивные ферменты позволяют микробам приспосабливаться к определенным условиям существования.

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

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

В 1885 г. Л. Пастер путем 133 последовательных интрацеребральных заражений кроликов изменил свойства возбудителя бешенства; вирус оказался авирулентным при подкожном введении и предупреждал развитие болезни у людей, покусанных бешеными животными. Л. Пастер назвал полученный им вирус фиксированным.

А. Кальметт и Ш. Герен во Франции в 1919 г. путем длительных пассажей на картофельной среде с желчью и глицерином при температуре 38°C значительно ослабили патогенные свойства возбудителя бычьего вида туберкулеза. Пересевы производили каждые 14 сут в течение 13 лет. Полученный таким образом штамм микобактерий туберкулеза бычьего вида был назван вакциной БЦЖ; ее с успехом применяют для прививок людей против туберкулеза.

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

У бактерий различают фенотипическую, или модификационную (ненаследственную), и генотипическую (наследственную) изменчивость.

Фенотипическая изменчивость. Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуумов называется **фенотипом**. Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно различаться по фенотипу, то есть по способу проявления наследственных признаков. Такие различия между микроорганизмами, одинаковыми по генотипу, называются **модификациями (фенотипическими адаптациями)**. Модификации, как правило, существуют до тех пор, пока действует вызвавший их специфический фактор окружающей среды; они не передаются потомкам и не наследуются ими. Это адаптивная реакция на внешние раздражители. Следовательно, роль фенотипических изменений сводится к обеспечению выживаемости микробных популяций в изменившихся условиях среды. Фенотипические изменения выражаются в изменении формы и размера бактерий, биохимической активности и ряда других свойств.

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

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

Мутации — внезапные, скачкообразные изменения наследственных свойств. Основу этого явления составляют качественные или количественные изменения последовательности нук-

леотидов в ДНК, которые могут возникать под влиянием эндогенных факторов или при действии химических и физических мутагенов. Бактерии с измененными признаками называются мутантами. Различают спонтанные и индуцированные мутации.

Спонтанные (самопроизвольные) мутации возникают под влиянием неизвестных причин. Частота спонтанных мутаций мала ($1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-10}$). Один из распространенных типов спонтанных мутаций микроорганизмов — ауксотрофность, то есть утрата способности к синтезу, например, лейцина, которой обладали клетки родительского типа. В этом случае мутант будет расти только на той среде, к которой добавлена эта аминокислота. Такой мутант называют ауксотрофным по лейцину, то есть нуждающимся в лейцине. Спонтанные мутации служат основным источником естественной изменчивости микроорганизмов и лежат в основе эволюции, обуславливая разнообразие генетического материала.

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

Бактериальные мутации могут проявляться следующим образом: изменение морфологических свойств; возникновение устойчивости к лекарственным препаратам; потеря способности синтезировать аминокислоты, утилизировать углеводы и другие питательные вещества; ослабление патогенных свойств.

Например, методом направленных мутаций получены живые вакцины с ослабленной вирулентностью, которые с успехом используют для профилактики листериоза (вакцина АУФ), сальмонеллеза свиней (вакцина ТС-177) и др.

4.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАЦИИ

Кроме мутаций, ведущих к изменению генотипа, у бактерий известны три способа передачи генетической информации от донорской клетки с одним генотипом реципиенту с другим генотипом. Эта передача осуществляется путем

трансформации, трансдукции и конъюгации. В результате генетического обмена между бактериями образуются рекомбинанты, то есть бактерии, обладающие свойством обоих родителей. Клетки-рекомбинанты в основном сохраняют генотип бактерии-реципиента, приобретая отдельные свойства бактерии-донора. Это связано с тем, что рекомбинант несет хромосому реципиента, в которую включаются только отдельные фрагменты ДНК донора.

Трансформация (преобразование, перестройка). Изменение генома бактерии-реципиента в результате поглощенного из среды свободного фрагмента ДНК клетки-донора. Впервые явление трансформации у бактерий наблюдал Ф. Гриффитс. Он одновременно ввел мышам две культуры пневмококков: первая — непатогенная бескапсульная, вторая — патогенная с капсулой, убитая нагреванием. Из крови погибших мышей были выделены патогенные с капсулой бактерии пневмококка третьего типа. Это означало, что убитые нагреванием клетки передали способность образовывать капсулу непатогенному бескапсульному штамму. В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Маккарти установили, что трансформирующим веществом служит ДНК.

В процессе трансформации различают пять стадий:

I — адсорбция трансформирующей ДНК на поверхность микробной клетки;

II — проникновение ДНК в клетку-реципиент;

III — спаривание внедрившейся ДНК с хромосомными структурами клетки;

IV — включение участка ДНК клетки-донора в хромосомные структуры реципиента;

V — дальнейшее изменение нуклеотида в ходе последующих делений.

Путем трансформации могут быть перенесены различные признаки: синтез капсульного полисахарида, устойчивость к антибиотикам, синтез ферментов и т. п. Обычно при трансформации изменяется один какой-нибудь признак. Процесс трансформации наблюдается среди бактерий различных семейств и родов.

Трансдукция — передача ДНК от клетки донора клетке-реципиенту при участии бактериофагов. Трансдуцирующими свойствами обладают в основном умеренные фаги. Размножаясь в бактериальной клетке, фаги включают в состав своей ДНК часть

бактериальной ДНК и передают ее после проникновения клетке-реципиенту. Различают три типа трансдукции: общую, специфическую и абортивную. При *общей* трансдукции фаг выступает в качестве «пассивного» переносчика генетического материала бактерий, захватывая в свою головку фрагмент бактериальной ДНК вместо своего генома. Эти фаги получили название дефектных фагов. Один и тот же фаг может трансдуцировать различные признаки: ферментативную активность, устойчивость к антибиотикам, подвижность, серологические и вирулентные свойства и др.

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

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

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

конъюгации клеток Hfr и F^- происходит разрыв хромосомы бактерии в месте прикрепления F -фактора.

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

4.4. ПЛАЗМИДЫ

Кроме хромосомы, у некоторых бактерий присутствуют дополнительные внехромосомные генетические детерминанты, получившие название **плазмид**. У бактерий обнаружено большое разнообразие плазмид, среди которых наиболее изучены половой фактор (F), фактор множественной лекарственной устойчивости (R), факторы бактериоциногенности, плазмиды, контролирующие у *E. coli* синтез энтеротоксина, плазмиды, детерминирующие синтез поверхностных антигенов, и др. Плазмиды расположены в цитоплазме, имеют кольцевую структуру и способны к саморепликации. Общее для всех плазмид свойство заключается в том, что они придают клетке дополнительные, необязательные для нее функции, но чаще всего выгодные. Плазмиды могут быть потеряны бактерией, однако это не влияет на основные свойства клетки. Плазмиды (F -фактор и др.), способные интегрировать в хромосому и реплицировать вместе с ней, получили название эписом.

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

Фактор множественной лекарственной устойчивости. R -фактор — типичная плаزمид, представляющая собой двуспиральную молекулу ДНК, в которой определены гены, ответственные

ные за саморепликацию и перенос резистентности в реципиентную клетку, — фактор переноса устойчивости RTF, и отдельные гены, обозначаемые буквой *r*, детерминирующие устойчивость к конкретному антибиотику. R-фактор может передаваться при трансдукции и обычном делении бактериальной клетки. Механизм, определяющий способность бактерий превращать антибиотики в неактивную форму, связан с действием на антибиотики особых специфических ферментов, синтез которых детерминируется R-плазмидой.

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

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

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

Контрольные вопросы и задания

1. Сформулируйте цели и задачи генетики микроорганизмов.
2. Что вы понимаете под термином «ген»?
3. Что такое диссоциация культуры?
4. Что означает термин «фенотипическая изменчивость»?
5. Что понимается под генетической изменчивостью?
6. Что вы понимаете под термином «мутация»?
7. Что такое трансформация, трансдукция и конъюгация?
8. Что такое колицины (бактериоцины)?
9. Что такое плазмиды?

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

5.1. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

5.1.1. ТЕМПЕРАТУРА

О влиянии температуры на микроорганизмы обычно судят по их способности расти и размножаться в определенных температурных границах. Для каждого вида бактерий определена оптимальная температура развития. В зависимости от пределов этой температуры бактерии разделены на следующие три физиологические группы: психрофильные, мезофильные и термофильные.

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

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

Термофильные бактерии часто и в большом количестве встречаются в почве, воде, теплых минеральных источниках,

а также в пищеварительном тракте животных и человека. Температурный минимум — 35°C, оптимум — 50–60, максимум — 70–75°C.

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

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микробов. При низких температурах микробная клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать длительное время. Так, эшерихии сохраняют жизнеспособность при –190°C до 4 мес., холерный вибрион при –45°C до 2 мес., возбудитель листериоза при –10°C до 3 лет.

Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы. На этом принципе основано сохранение продуктов в ледниках, погребах и холодильниках. В микробиологической практике широко применяется длительное хранение культур микробов, иммунноглобулинов антибиотиков живых вакцин в высушенном виде из замороженного состояния. Метод получения сухих культур микроорганизмов путем высушивания из замороженного состояния (–76°C) под высоким вакуумом называется **лиофилизацией**.

При лиофилизации свободная вода и вода, непрочно связанная с гидрофильными веществами клеток, подвергается замораживанию, и затем происходит сублимация льда, т. е. переход его из твердого состояния в парообразное, минуя жидкую фазу. В результате получается сухая пористая масса, которая при добавлении к ней воды легко суспендируется.

Повторные замораживание и оттаивание неблагоприятно воздействуют на микроорганизмы и могут стать причиной их гибели при лиофилизации.

Высокая температура, особенно нагревание паром под давлением, губительно действует на микробов. Чем выше температура предела максимума, тем быстрее погибают вегетативные формы микроорганизмов: при 60°C — через 30 мин, при 70°C —

через 10–15, при 80–100°C — через 1 мин. В основе бактерицидного действия высоких температур лежит разрушение ферментов каталазы, оксидаз, дегидраз за счет денатурации (свертывания) белков и нарушения осмотического барьера. Споры бактерий более устойчивы к действию высокой температуры. Воздействие высокой температурой — самый распространенный, удобный и надежный способ **стерилизации** — обеспложивания — уничтожения различных микробов и их спор в разнообразных объектах. Существуют разные способы стерилизации: прокаливание на огне, кипячение, стерилизация сухим паром в печах Пастера (сухожаровые шкафы), стерилизация паром под давлением в автоклавах, без давления в аппарате Коха, тиндализация (дробная стерилизация при 56–58°C).

Стерилизации подвергают перевязочный материал, хирургический инструмент, различные растворы.

Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранении, хирургических вмешательствах, называется **асептикой**. Уничтожение микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (растворы хлора, йода, перексид водорода, калия перманганата, этикридина лактата, метиленового синего, бриллиантового зеленого, азотнокислого серебра и др.) называется **антисептикой** (от *греч.* anti — против; septikos — гнилостный).

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

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

Дегидратация (обезвоживание) вегетативных форм бактериальных клеток преимущественно вызывает их гибель. Неко-

торые микроорганизмы, в особенности морские и пресноводные, а также патогенные виды быстро погибают при высыхании, т. е. не могут существовать без воды или соков животного организма. Споры, конидии, артрспоры или хламидоспоры — все это, в сущности, покоящиеся клетки, специально адаптированные к длительному пребыванию в сухом виде.

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

5.1.2. ГИДРОСТАТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

Данный фактор окружающей среды также влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. Чувствительность бактерий к гидростатическому давлению неодинакова. Бактерии, устойчивые к высокому давлению, называют барофильными. Они существуют при давлении в $1 \cdot 10^5$ Па (выделены из образцов, взятых со дна океанов, с глубины 5 тыс. м); споры бацилл сохраняются при давлении $2 \cdot 10^6$ Па. Режим повышенного давления ($1 \cdot 10^3$ – 10^6 Па) в сочетании с высокой температурой (120°C) используют в автоклавах в целях обезвреживания (стерилизации) материалов, содержащих возбудителей инфекционных болезней.

В настоящее время в микробиологии возникло новое направление — **баробиология**, изучающее роль гидростатического давления как экологического фактора, оказывающего влияние на распространение и активность микроорганизмов в глубине морей и океанов.

5.1.3. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ СРЕДЫ

Осмотическое давление среды, определяемое концентрацией растворенных в ней веществ, выполняет важную роль в метаболизме микробной клетки. Внутри бактерий осмотическое давление соответствует давлению 10–20% -го раствора сахаразы. В среде с более высоким осмотическим давлением наступает **плазмолиз** (потеря воды и гибель клетки), а в среде с низким

осмотическим давлением — **плазмолиз** (вода поступает внутрь клетки и клеточная стенка может разорваться). Явления плазмолиза и плазмолиза используют в промышленности и в быту для консервирования продуктов (огурцы, помидоры, капуста и др.).

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

5.1.4. РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ ИЗЛУЧЕНИЯ

Степень бактерицидного действия излучения на микробов зависит от вида лучевого излучения, дозы и длительности экспозиции.

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

Микроорганизмы, не образующие пигменты, можно сделать чувствительными к искусственному свету, если окрасить их

метиленовой синью, эозином и др. Это явление названо **фотосенсибилизацией**, а действие — **фотодинамическим**.

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

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

Бактерицидность света усиливают некоторые краски (эозин, метиленовая синь и др.). Гигиеническое значение воздействия солнечного света огромно, оно представляет собой один из факторов самоочищения воздуха, рек и верхних слоев почвы.

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

При облучении микробов УФИ с длиной волны 320–400 нм возможна фотореактивация, то есть восстановление жизнеспособности микроорганизмов.

УФИ широко применяют для санации воздуха в животноводческих помещениях, в лабораториях и промышленных цехах (бродильная промышленность, производство антибиотиков), в боксах для создания асептических условий. Для дезинфекции воздуха предназначены лампы низкого давления типа БУВ-15, БУВ-30, БУВ-30П, БУВ-60П и ДБ-60. На основе использования ультрафиолетовых и инфракрасных ламп для

животноводческой практики применяют установку ИКУФ-1. Промышленностью выпускаются также бактерицидные облучатели с одной или двумя лампами БУВ-30 или БУВ-60П, последние широко применяются в животноводстве и птицеводстве для дезинфекции воздуха помещений.

Ионизирующее излучение. Рентгеновское излучение — электромагнитное излучение с длиной волны 0,006–10 нм; гамма-излучение — коротковолновое излучение, бета-излучение или катодное излучение (высокоскоростные электроны); альфа-излучение или высокоскоростные ядра гелия и нейтроны оказывают слабое инактивирующее действие на микроорганизмы. Бактерицидность наиболее сильнодействующего гамма-излучения слабее, чем УФИ, — гибель бактерий наступает только при облучении высокими дозами от 44 000 до 280 000 рентген. Бактерии обнаружены в воде атомных реакторов, где величина радиоактивного облучения достигает 2–3 млн рентген. Микроорганизмы, находящиеся на расстоянии 3–5 см от источника облучения, погибают через 5–6 ч, на расстоянии 10 см — через 48 ч.

Механизм действия рентгеновского излучения заключается в поражении ядерных структур, в частности, нуклеиновых кислот цитоплазмы, то есть поражается генетический аппарат микробной клетки, что приводит к ее гибели или мутации. Неблагоприятное воздействие ионизирующих излучений усиливается в присутствии кислорода.

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

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

5.1.5. ЭЛЕКТРИЧЕСТВО

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

5.1.6. УЛЬТРАЗВУК

Ультразвук (волны с частотой около 20 000 Гц) используют для стерилизации пищевых продуктов и дезинфекции предметов. Механизм его бактерицидного действия заключается в том, что в цитоплазме микроорганизмов, находящихся в жидкой среде (вода, молоко), образуется кавитационная полость, которая заполняется парами жидкости, в пузырьке возникает давление в $1 \cdot 10^6$ Па, что приводит к дезинтеграции цитоплазматических структур. Возможно, что в образующихся кавитационных полостях озвученной среды возникают высокореактивные гидроксильные радикалы, которые парализуют жизнедеятельность микроба.

5.1.7. АЭРОИОНИЗАЦИЯ

Аэроионы, несущие положительный или отрицательный заряд, возникают в результате искусственной или естественной ионизации воздуха. Наибольшее влияние на бактерии оказывают отрицательно заряженные ионы, действуя уже в средних концентрациях ($5 \cdot 10^4$ в 1 см^3 воздуха). Аэроионы положительные задерживают рост бактерий лишь в больших концентрациях (10^6). Сила действия ионов зависит от дозы числа аэроионов на 1 см^3 воздуха, длительности экспозиции, расстояния от источника ионов. Используют для обезвреживания цехов предприятий, жилых помещений, а также в медицинской и ветеринарной практике.

5.2. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

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

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

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

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

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

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

Механизм бактерицидного действия заключается в том, что положительно заряженные ионы металлов адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности бактерий и изменяют проницаемость их цитоплазматической мембраны, в результате чего происходит гибель микробной клетки.

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

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

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

Поверхностно-активные вещества. Катионные детергенты (церигель, дегмицид, этоний, декаметоксин и роккал) представляют собой соединения четвертичных аммонийных оснований, содержащих радикалы с длинной цепью углеродных атомов. Анионные детергенты нарушают проницаемость и осмотическое

равновесие микробной клетки, что и приводит к ее гибели; к ним относится зеленое мыло.

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

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

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

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

Формальдегид — бесцветный газ. В практике применяют 40% -й водный раствор формальдегида (**формалин**). Растворенный в воде формальдегид губительно влияет на вегетативные и споровые формы бактерий; вызывает дегидратацию поверхнос-

тных слоев, легко проникает в бактериальную клетку, вступает в связь с аминокруппами белков, денатурирует их.

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

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

5.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Явление антагонизма микроорганизмов впервые открыл в 1887 г. французский ученый Л. Пастер. Одним из первых практически использовал микробный антагонизм И. И. Мечников, который предложил использовать содержащие молочнокислые бактерии продукты для подавления гнилостной микрофлоры кишечника.

5.3.1. АНТИБИОТИКИ

Антибиотики — биологически активные вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности грибов, бактерий, животных, растений, а также созданные синтетическим путем, способные избирательно подавлять рост и убивать микроорганизмы,

грибы, риккетсии, крупные вирусы, простейшие и отдельные виды гельминтов. Они отнесены к химиотерапевтическим средствам и предназначены для избирательного действия на возбудителей заболеваний, находящихся во внутренних органах и тканях (кровь, лимфа, межтканевая жидкость) больных животных и людей.

Начало учению об антибиотиках было положено в 1929 г., когда английский ученый А. Флеминг доказал, что фильтрат бульонной культуры плесневого гриба обладает антибактериальными свойствами в отношении стафилококков и некоторых других грамположительных микроорганизмов. Однако извлечь пенициллин из культуральной жидкости плесневого гриба удалось лишь в 1940 г. группе английских химиков (Э. Чейн, Г. Флори и Э. Эбрахем). В СССР пенициллин был получен З. В. Ермольевой в 1942 г. Открытие пенициллина послужило толчком для широких поисков антибиотических веществ. В настоящее время их насчитывается более 2000, выделенных из различных источников.

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

По происхождению антибиотики можно разделить на пять групп.

1. Образованные грибами и лишайниками. Грибы и лишайники являются продуцентами активных антибиотиков. Так, из культуральной жидкости выделен пенициллин, цефалоспорин, фумагиллин, гризефульвин, трихотецин. Лишайники производят усниновую кислоту, обладающую сильным антибиотическим действием. К натриевой соли усниновой кислоты особенно чувствительны дифтерийные палочки.

2. Образованные актиномицетами. Из культуральных жидкостей актиномицетов были выделены многие антибиотики: *Streptomyces greseus* — стрептомицин, *Str. fradiae* — неомицин, *Str. canamyceticus* — канамицин, *Micromonospora purpurea* — гентамицин, *Str. aureofaciens* — хлортетрациклин, *Str. venezuelae* — хлорамфеникол, *Str. erythreus* — эритромицин, *Str. fradiae* — тилозин, *Str. bevoris* — леворин, *Str. spheroids* — новобиоцин, *Str. mediterranei* — рифамицин, *Str. neusei* — нистатин.

3. Выделенные из бактерий. Группа антибиотиков бактериального происхождения менее обширна и имеет меньшее

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

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

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

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

Под влиянием некоторых фитопатогенных грибов ткани пшеницы, ржи, кукурузы образуют антибиотические вещества —

фитоалексины, обладающие антибиотическим действием по отношению к фитопатогенным грибам. Так, клетки гороха продуцируют пизатин, клетки фасоли — фазеолин.

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

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

Антибиотики обладают характерными свойствами — четкой выраженной избирательностью и специфическим механизмом противомикробного действия. Каждый антибиотик имеет определенный антимикробный спектр действия — узкий (пенициллин, грамицидин) или широкий (левомицетин, тетрациклин, полимиксин, гентамицин и др.).

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

- 1) ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин);
- 2) нарушающие функцию цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин);

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

4) избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот: ингибиторы синтеза РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин и др.); ингибиторы синтеза ДНК (брунеомицин, саркомицин).

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

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

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

Устойчивость микробов к антибиотикам. Целый ряд микробов под влиянием антибиотиков, особенно при неправильном их применении, утрачивает чувствительность к ним и образует антибиотикорезистентные формы. Устойчивость к антибиотикам возникает в результате нарушения трансляции генетической информации и изменения синтеза полипептидной цепи, пониженной проницаемости цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, образования ферментов, инактивирующих

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

Чтобы предотвратить возникновение резистентных микробов при лечении, необходимо комбинировать антибиотики или использовать их в сочетании с другими химиотерапевтическими средствами (сульфаниламиды, нитрофураны, производные оксихинолина) и применять препараты, повышающие иммунологическую реактивность организма.

5.3.2. БАКТЕРИОФАГИ

Явление бактериофагии изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Творт (1915), Ф. Д'Эрелль (1917). В результате агент, разрушающий бактерии, был назван бактериофагом. Бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

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

Хозяевами бактериофагов являются многие микробы, в частности эшерихии и сальмонеллы, стафилококки и стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и другие микроорганизмы. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой обусловлено наличием рецепторов, на которых может фиксироваться фаг; наличием в клеточной оболочке и цитоплазме ферментов, способствующих проникновению нуклеиновой кислоты (вещества, из которого строятся гены); наличием в клетке ферментов, материалов и энергетических ресурсов, обеспечивающих синтез компонентов фага и формирование частиц фага (вирионов).

Процесс взаимодействия фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции, или лизогении. Различают вирулентные и умеренные фаги. **Вирулентные** фаги при проникнове-

нии в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис; **умеренные фаги** не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

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

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

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

II. Проникновение. После адсорбции ДНК фага через дистальный конец отростка продвигается сквозь рыхлые слои клеточной стенки, которые разрушаются под действием фагового лизоцима.

III. Биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты РНК и белков капсида, которые участвуют в биосинтезе ДНК фага. Латентный (скрытый) период длится около 15 мин.

IV. Морфогенез фага. Этот процесс заключается в заполнении фаговой нуклеиновой кислотой пустотелых фаговых капсид и формировании зрелых вирионов (частиц фага).

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

При контакте умеренного бактериофага с микробной клеткой последняя не лизируется и становится носителем бактериофага. Это явление получило название **лизогении**, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называют **лизогенными**. Различают монолизогенность и полилизогенность.

Бактериальная культура, образующая один вид фага, называется **монолизогенной**. Бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется **полилизогенной**. Фаг,

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

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

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

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

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

В микробиологической практике бактериофаги востребованы для дифференциации бактериальных культур (сибиреязвенных, стафилококковых, рожистых, сальмонеллезных и др.). С помощью фага возможна индикация патогенных бактерий в

окружающей среде (вода, выделения животных, пищевые продукты и другие субстраты) с помощью реакции нарастания титра фага.

Биологическая промышленность выпускает в жидкой форме фаги против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибиреязвенные (фаг-гамма, фаг ВИЭВ) и др.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое стерилизация, асептика, антисептика, дезинфекция, пастеризация?
2. В чем состоит механизм действия физических, химических и антибиотических веществ на бактерии?
3. На чем основана микробиологическая оценка качества дезинфекции?
4. В чем суть феномена бактериофага?
5. Какова схема основных этапов взаимодействия фага с бактериальной клеткой?

ГЛАВА 6. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

В отличие от термина «местообитание» понятие **«экологическая ниша»** отражает не место в пространстве, а функцию какого-то вида или популяции в сообществе организмов. Экологическая ниша характеризует «профессию» вида. Можно исходить из того, что каждый вид (или популяция) выполняет определенную функцию, которая обусловлена его (ее) потребностями в пище, подвижностью, способом размножения, биохимическими, структурными особенностями, пределами толерантности (терпимости) к условиям среды.

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

Первые следы жизни появились более 3 млрд лет назад; это были микроорганизмы, которые преобладали в биосфере Земли примерно 2,5 млрд лет. Прокариоты не только стояли у истоков земной жизни, положив начало развитию многообразия эукариотических форм, но продолжают и после этого свое существование. С тех времен сложились сложные взаимоотношения между микроорганизмами, с высшими организмами растительного и животного царства, с одной стороны, и окружающей средой — с другой. В настоящее время эти взаимоотношения можно представить в виде следующих форм. Тесное сожительство двух различных организмов называют **симбиозом**. Если говорить об относительной пользе, извлекаемой партнерами из симбиоза, то можно выделить следующее:

- сожительство создает благоприятные условия для обоих партнеров (взаимовыгодный симбиоз-мутуализм);
- один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого (в этом случае говорят о паразитизме, об антагонизме);
- партнеры могут не оказывать друг на друга никакого влияния (нейтрализм);
- партнерство может быть выгодно одному из организмов без оказания вредного воздействия на другого (комменсализм).

Среди разнообразнейших представителей мира микробов развились различные формы симбиотических взаимоотношений. Взаимно полезные отношения сложились между аэробными бактериями, обитающими в почве, в отделе толстого

кишечника и других субстратах, и анаэробными. Аэробные бактерии используют кислород, присутствующий в почве, тем самым создают благоприятные условия для анаэробов. В свою очередь, последние разлагают целлюлозу, образуя органические кислоты, которые являются источником энергии для аэробных бактерий. Такие взаимоотношения существуют между простейшими и водорослями, симбиоз азотобактера с бактериями, разлагающими целлюлозу, между молочнокислыми бактериями и дрожжами в кефирных зернах и т. д.

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

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

6.1. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ, НАВОЗА

В почве живут и развиваются самые разнообразные микроорганизмы: амёбы, инфузории, грибы, водоросли, актиномицеты и бактерии. Из структурных частей почвы для микробиологии особый интерес представляет ее органическое вещество — **гумус**, состоящий из остатков животных и растительных организмов и обитающих в почве микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, так как на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовое излучение, солнечный свет, повышенная температура и др. Наиболее многочисленны микроорганизмы в верх-

нем 5–15-сантиметровом слое, меньше их на глубине 20–30 и минимальное количество — на глубине 30–40 см. Однако бактерии были найдены в почве даже на глубине 5 м.

Почвы, богатые бактериями, биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый гектар малоплодородной почвы приходится 2,5–3 т микробной массы, высокоплодородной — до 16 т. Число микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от $1-3 \cdot 10^6$ до $20-25 \cdot 10^9$.

Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны — песчаные, горные, а также почвы, лишённые растительности; содержание микробов в почве увеличивается с севера на юг.

Цвет и запах почвы зависят также от состава микроорганизмов. Запах почве придают определенные виды актиномицетов. К типичным почвенным бактериям относятся *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*, а также термофильные, пигментные, непигментные и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80–90% всей микрофлоры почвы.

В ряде случаев почва представляет собой резервуар для некоторых патогенных микробов, попадающих в нее с выделениями больных животных или трупами. Длительность выживаемости в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. «Долгожителями» являются спорообразующие микробы — возбудители столбняка, злокачественного отека, ботулизма; споры бацилл сибирской язвы могут сохраняться десятилетиями. При благоприятных условиях микробы в почве не только выживают, но и долго (недели, месяцы и даже годы) сохраняют вирулентные свойства.

Навоз — ценное удобрение, повышающее плодородие почв и улучшающее их структуру. Из-за содержания в нем значительного количества органических соединений он служит хорошей средой для развития сапрофитных и некоторых патогенных микробов, которые в нем могут длительное время сохранять жизнеспособность (поэтому свежий навоз в качестве удобрения не применяют). Состав микрофлоры обусловлен теми видами микроорганизмов, которые обитают в кишечнике животных.

В настоящее время приняты два способа хранения навоза — в штабелях и в специальных траншеях-навозохранилищах, что способствует интенсивному размножению в нем термофильных микробов, создающих высокую температуру, за счет которой происходит **санирование навоза** — гибель патогенных микробов и гельминтов. Это необходимо для проведения профилактических и оздоровительных мероприятий в отношении инфекционных и инвазионных болезней сельскохозяйственных животных. Такой метод обеззараживания навоза называется **биотермическим**, он повсеместно используется в животноводческой практике.

6.2. МИКРОФЛОРА ВОДЫ

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

Качественный состав обитающих в воде микроорганизмов зависит в основном от свойств самой воды, поступления в нее сточных и промышленных отходов. К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus roseus*.

Кроме сапрофитов в воде могут присутствовать возбудители инфекционных болезней животных и человека.

6.3. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда микробы вместе с пылью и капельками влаги увлекаются в атмосферу. Воздух — неблагоприятная среда для размножения микроорганизмов. Отсутствие питатель-

ных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов. Вследствие этого микрофлора воздуха менее обильна, чем микрофлора почвы и воды.

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

В животноводческих помещениях воздушная среда загрязняется микробами во время раздачи кормов, особенно грубых; при чихании, кашле животных, разговоре обслуживающего персонала. Попадают микробы в воздух и с частицами высохших фекалий животных, доказано, что в 1 м³ воздуха животноводческих помещений содержится до двух и более миллионов микробных тел, в том числе и патогенных.

Степень загрязнения воздуха микроорганизмами зависит от вентиляции, скученности животных, конструкции помещений, способа содержания животных и других факторов. В плохо вентилируемых помещениях число микробов в 1 м³ воздуха в 5–6 раз больше, чем в хорошо вентилируемых,

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

6.4. МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ

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

Облигатная микрофлора (резидентная, аутохтонная) имеется у всех здоровых животных. Аллохтонные микроорганизмы — сапрофитные, патогенные или условно-патогенные микроорганизмы, попадающие в различные экониши извне и пребывающие в них в виде вегетативных клеток временно и в состоянии покоя (эндоспоры, акинеты и др.) длительное время. Их характеризует быстрый периодический рост, но низкая конкурентоспособность в условиях незначительного поступления субстрата.

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

Из палочковидных форм обнаруживают кишечную, синегнойную палочки протей и др. Также на коже присутствуют микробы из группы аэробов и анаэробов. Количество микробов на коже зависит от условий содержания животных: при плохом уходе на 1 см² поверхности кожи может находиться до 1–2 млрд микробных тел.

Микрофлору вымени составляют преимущественно микрококки стафилококки, стрептококки, коринебактерии. Поверхность кожи вымени из-за наличия мелких складок служит местом скопления разнообразных микробов, которые обитают в животноводческих помещениях, на пастбищах, в подстилке, кормах, на руках доярки и других объектах. При недостаточно тщательной уборке и дезинфекции помещения обычно обнаруживается более 10⁵ микробов на 1 см² кожи вымени, в результате чего вымя может быть одним из главных источников загрязнения выдоенного молока.

Из патогенных микробов на коже вымени часто встречаются возбудители маститов.

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

Микрофлора дыхательных путей. У новорожденных животных в легких микроорганизмов нет. При дыхании на слизистые оболочки верхних дыхательных путей оседают из воздуха различные бактерии, актиномицеты, плесневые и дрожжевые

грибы, микоплазмы и др. Постоянными обитателями слизистых оболочек носоглотки, зева в основном являются кокковые формы бактерий — стрептококки, стафилококки, микрококки.

Микрофлора пищеварительного канала является наиболее обильной. У только родившихся животных в ЖКТ микробы отсутствуют. Через несколько часов организм животного заселяется микрофлорой, которая в процессе жизни видоизменяется. У взрослых животных она в основном остается стабильной до конца жизни.

Микрофлору пищеварительного канала принято делить на *факультативную*, которая может меняться в зависимости от вида корма и условий содержания животных, и *облигатную*, то есть *постоянную*, приспособившуюся к условиям среды желудочно-кишечного тракта. К постоянной микрофлоре относятся бифидобактерии, молочнокислые стрептококки, молочнокислые палочки, кишечная палочка, целлюлозорасщепляющие, уксуснокислые, пропионовокислые и др.

Микрофлора полости рта. В ротовой полости обнаружено более 100 видов микроорганизмов. К постоянным обитателям ротовой полости относятся диплококки, стафилококки, сарцины, микрококки, дифтероиды, анаэробы и аэробы, целлюлозоразрушающие бактерии, спирохеты, грибы, дрожжи и др.

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

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

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

В желудке свиньи главные представители микрофлоры — молочнокислые бактерии, различные кокки, сбраживающие

углеводы, актиномицеты, дрожжи. Микрофлора желудка лошади более многочисленна и разнообразна: ближе к привратнику она бедна, в преддверии желудка микробы концентрируются в большом количестве.

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

В рубце жвачных происходят сложные микробиологические и биохимические процессы, связанные с расщеплением питательных веществ. Эти микроорганизмы переваривают клетчатку с помощью фермента целлюлозы до глюкозы, которая легко усваивается другими микроорганизмами. Стрептококки сбраживают крахмал, глюкозу с образованием молочной кислоты. Пропионовокислые бактерии сбраживают лактаты с образованием пропионовой кислоты, частично масляной и уксусной, продуцируют витамины группы В. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением А, Е, Г.

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

Микрофлора толстых кишок наиболее богатая. Постоянные обитатели — энтерококки, стафилококки, стрептококки, целлюлозорасщепляющие бактерии, актиномицеты, ацидофилы, спорообразующие микробы, дрожжи, плесени, гнилостные бактерии. Обилие микроорганизмов в толстых кишках объясняется наличием в них больших объемов переваренной пищи. Установлено, что треть сухого вещества фекальных масс составляют микробы. Микробиологические процессы продолжаются в отделе толстых кишок. У разных видов животных, в том числе

птиц, микрофлора представлена разнообразными ассоциациями микробов; она может быть как постоянной, так и непостоянной.

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

Микрофлора мочеполовых органов. На слизистой оболочке половых органов присутствуют стафилококки, стрептококки, микрококки, дифтероиды, кислотоустойчивые микобактерии и др. Наиболее частый обитатель слизистой оболочки влагалища — *Bact. vaginale vulgare*, у которой резко проявляется антагонизм к другим микроорганизмам. У здоровых животных микрофлору обнаруживают только на наружных участках мочеполовых путей. Матка, яичники, семенники, мочевого пузыря в нормальном состоянии стерильны. При заболеваниях мочеполовых органов (метриты, эндометриты) микрофлора влагалища изменяется.

Таким образом, на поверхности тела животных, в открытых и закрытых полостях постоянно присутствует разнообразная микрофлора, в основном безвредная, но иногда и патогенная. При нормальных условиях в организме поддерживается определенный полезный микробиоценоз. При снижении резистентности макроорганизма условно-патогенные микроорганизмы, быстро развиваясь, вызывают болезни (пневмонии, энтериты и др.).

Следует учесть, что у здоровой самки плод в матке стерилен до момента родов. Таким образом, в процессе филогенетического развития в открытых полостях животного организма сформировалась микроэкологическая система, характерная для определенного вида животного и каждого полостного органа или отдела.

6.5. НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА

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

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

Во-первых, нормальная микрофлора играет важнейшую роль в формировании иммунологической реактивности организма.

Во-вторых, представители нормальной микрофлоры благодаря продуцированию разнообразных антибиотических соединений и выраженной антагонистической активности предохраняют органы, сообщающиеся с окружающей средой, от внедрения и безграничного размножения в них патогенных микроорганизмов.

В-третьих, флора обладает выраженным морфокинетическим действием, особенно по отношению к слизистой оболочке тонкой кишки, что существенно отражается на физиологических функциях пищеварительного канала.

В-четвертых, микробные ассоциации являются существенным звеном в печеночно-кишечной циркуляции таких важнейших компонентов желчи, как соли желчных кислот, холестерина и желчных пигментов.

В-пятых, микрофлора в процессе жизнедеятельности синтезирует витамин К и ряд витаминов группы В, некоторые ферменты и, возможно, другие, пока неизвестные биологически активные соединения.

В-шестых, микрофлора исполняет роль дополнительного ферментного аппарата, расщепляя клетчатку и другие трудно перевариваемые составные части корма.

Нарушение видового состава нормальной микрофлоры при возникновении инфекционных и соматических заболеваний, а также в результате длительного и нерационального использования антибиотиков приводит к развитию **дисбактериоза**, который характеризуется изменением соотношения популяций различных видов бактерий, нарушением усвояемости продуктов пищеварения, изменением ферментативных процессов и другими отрицательными явлениями. С целью коррекции дисбактериоза следует устранить факторы, вызвавшие этот процесс.

Возникает вопрос: возможна ли жизнь животных без микробов? Известно, что у птиц и животных арктических мест обитания очень редко обнаруживают микроорганизмы. Еще

Л. Пастер пытался вывести безмикробных животных, но уровень знаний и технического оснащения не позволили решить эту задачу.

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

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

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

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

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите основную микрофлору почвы.
2. Какая микрофлора присутствует в воде?
3. Какая микрофлора присутствует в воздухе?
4. Какова основная микрофлора кожи и дыхательных путей?
5. Какую микрофлору рубца вы знаете и какова ее роль в пищеварении?
6. Охарактеризуйте микрофлору толстого отдела кишечника.

ГЛАВА 7. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

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

7.1. КРУГОВОРОТ АЗОТА

Азот — важнейший биогенный элемент, входящий в состав белковой молекулы каждого живого существа. Азот составляет 80% атмосферы. Столб воздуха над гектаром почвы содержит до 80 тыс. т азота.

Однако ни растения, ни животные не могут его использовать в такой форме. Растения потребляют азот минеральных соединений, а животные — в форме органических соединений. Только специфическая группа микроорганизмов обладает способностью фиксировать и строить из него все разнообразие азотсодержащих органических соединений своей клетки. Источником азота для синтеза аминокислот и белков служат нитраты почвы и воды.

Цикл превращений азота в природе с участием микроорганизмов состоит из четырех этапов: фиксации атмосферного азота, аммонификации, нитрификации и денитрификации (рис. 13).



Рис. 13
Круговорот азота в природе

7.1.1. ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА

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

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

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

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

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

К симбиотическим азотфиксаторам относятся бактерии рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии) — подвижные палочки 1,2–3 мкм длиной и 0,5–0,9 мкм шириной, грамотрицательные, спор не образуют. При старении бактерии теряют подвижность. Клубеньковые бактерии способны внедряться в корневые волоски бобовых растений и развиваться в них с образованием на корнях клубеньков, где и происходит фиксация азота. Таким образом, между бактериями и растениями устанавливаются симбиотические отношения. Бактерии питаются органическими соединениями, синтезированными растениями, а растения получают из клубеньков связанные соединения азота. При достаточной аэрации почвы, влажности и температуре клубеньковые бактерии в течение года на 1 га могут зафиксировать до 200 кг атмосферного азота, что значительно повышает плодородие почвы.

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

7.1.2. АММОНИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

Значительные запасы органического азота сохраняются в растительных и животных тканях. Компоненты тканей погибших растений и животных подвергаются действию микроорганизмов, и азотистые соединения разрушаются с образованием

аммиака. Этот процесс называют аммонификацией, или минерализацией азота. Процесс аммонификации может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях при участии различных микроорганизмов бактерий, бацилл.

Расщепление белковых веществ происходит за счет протеолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами, названных гнилостными. Глубина расщепления белковых веществ зависит от вида микробов и условий их жизнедеятельности. За счет аэробной гнилостной микрофлоры происходит глубокий распад белка, конечными продуктами которого являются аммиак, CO_2 , сульфаты и вода. При распаде белка в анаэробных условиях образуется аммиак, CO_2 , органические кислоты, меркаптаны, а также индол, скатол, обладающие неприятным запахом. Аммонификация остатков растений, трупов, других органических субстратов ведет к обогащению почвы азотистыми продуктами. Одновременно гнилостные микробы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата.

К аэробным аммонификаторам относятся:

- *Bac. mycoides* — широко распространенная в природе подвижная палочка, грамположительная, образует споры;
- *Bac. subtilis* — подвижная палочка, грамположительная, образует споры;
- *Bac. megatherium* — подвижная палочка, грамположительная.

Из анаэробных микроорганизмов наиболее активны:

- *C. putrificum* — подвижная палочка, грамположительная, обнаруживается в кишечнике, почве, навозе;
- *C. sporogenes* — подвижная палочка, грамположительная, обнаруживается в почве, кишечнике.

7.1.3. АММОНИФИКАЦИЯ МОЧЕВИНЫ

Подсчитано, что весь животный мир земного шара за сутки выделяет более 150 тыс. т мочевины. В моче содержится 47% азота, поэтому она считается одним из концентрированных азотистых удобрений. Мочевина непригодна для азотистого питания растений, и только после разложения ее микроорганизмами она становится усвояемой. Бактерии, разлагающие мочевины, называются уробактериями. Под действием фермента

уреазы, вырабатываемого уробактериями, мочевины превращается в аммиак и CO_2 . К уробактериям относят:

- *Bac. probatus* — крупная палочка, подвижная, грамположительная, образует споры;
- *Sporasarcina* — образует крупные шарообразные клетки, соединенные в пакеты, имеет жгутики.

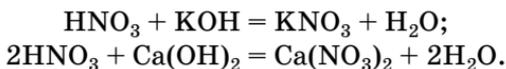
7.1.4. НИТРИФИКАЦИЯ

Нитрификация — следующий за аммонификацией этап превращения азота микроорганизмами. Аммиак, образующийся в почве, навозе и воде при разложении органических веществ, довольно быстро окисляется сначала в азотистую, а затем в азотную кислоту. Протекает процесс нитрификации в две фазы.

1. Окисление солей аммония до солей азотистой кислоты (нитритов) осуществляют микроорганизмы родов *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*.

2. Окисление азотистой кислоты до солей азотной кислоты (нитраты) — осуществляют бактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*.

Образовавшаяся азотная кислота в почве вступает в соединение с щелочами с образованием селитры:



Селитра хорошо растворяется в воде и усваивается растениями, в результате чего повышается плодородие почвы.

Бактерии рода *Nitrosomonas* имеют форму палочек, подвижны, грамотрицательны, с одним жгутиком, широко распространены в почве. Род *Nitrococystil* способен образовывать зооглеи (кокковые формы микробов, окружены общей капсулой). Бактерии рода *Nitrospira* имеют правильную спиральную форму. Род *Nitrobacter* — полиморфные мелкие палочки, неподвижные, грамотрицательные.

7.1.5. ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

Это процесс, обратный нитрификации. Различают прямую и косвенную денитрификацию. Прямую вызывают бактерии, широко распространенные в почве, навозе, водоемах. Среди них наибольшее значение имеют: палочка, не образующая спор, факульт-

тативный анаэроб; *Pseudomonas fluorescens* — подвижная палочка, грамотрицательная, образует зеленоватый пигмент; *Ps. stutzeri* — палочка, образующая цепочки; *Paracoccus denitrificans* — имеет форму кокков. Денитрифицирующие бактерии восстанавливают нитраты до молекулярного азота. В почве развиваются без доступа воздуха и в щелочной среде. Косвенная денитрификация осуществляется чисто химическим путем при взаимодействии азотистой кислоты с аминными соединениями; роль микробов сводится к образованию нитритов главным образом из нитратов. Косвенной денитрификации способствуют самые разнообразные виды микробов, которые не только восстанавливают нитраты, но и разлагают белковые вещества с образованием аминокислот.

7.2. КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

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

7.2.1. РОЛЬ МИКРОБОВ В РАЗЛОЖЕНИИ КЛЕТЧАТКИ

В состав клетчатки (целлюлозы) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Клетчатка — наиболее распространенный полисахарид растительного мира; высшие растения на 15–50% состоят из целлюлозы. После гибели растений она подвергается разложению, в результате чего освобождается углерод. Разложение клетчатки происходит в аэробных и анаэробных условиях. В природе распад клетчатки происходит

повседневно в почве, водоемах, навозе, пищеварительном тракте травоядных благодаря ферментам, которые выделяют различные микроорганизмы.

Аэробное разложение (брожение) клетчатки наиболее интенсивно происходит под влиянием следующих трех широко распространенных в природе родов микроорганизмов:

- *Cytophaga* — подвижные с заостренными концами палочки;
- *Cetacacula* — короткие с заостренными концами палочки;
- *Ceivirio* — длинные палочки, слегка изогнутые.

Кроме того, в аэробных условиях клетчатку разлагают актиномицеты.

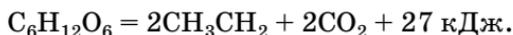
Анаэробное брожение клетчатки происходит в два этапа: сначала клетчатка осаживается, затем сахар разлагается в зависимости от типа брожения на спирты, молочную, масляную кислоты, углекислоту, водород, метан и др. Известно, что в природе за счет деятельности двух анаэробных бактерий-целлюлозоразрушителей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

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

Разложение пектиновых веществ. Разрушение погибших растений происходит при активном участии микроорганизмов, разрушающих пектиновые межклеточные вещества, связывающие растительные клетки. Пектиновое брожение происходит при мочке льна, конопли, джута и др. Целлюлозные волокна этих растений склеены с окружающими их тканями пектином.

7.2.2. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

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



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

В зависимости от того, в каких условиях происходит процесс (аэробный или анаэробный), дрожжи делят на дрожжи верхового и низового брожения. **Дрожжи верхового брожения** находятся в верхних слоях сусла, куда они поднимаются образующейся углекислотой и пеной. Брожение идет с незначительным повышением температуры (20–28°C). Через 5–7 сут верховое брожение заканчивается, а дрожжи за 1–2 сут до окончания брожения образуют хлопья и оседают на дно бродительных емкостей. **Дрожжи низового брожения** развиваются в анаэробных условиях и при более низкой температуре (6–12°C), поэтому процесс протекает медленно (8–10 сут). Они также оседают на дно и образуют хлопьевидный осадок.

Значение спиртового брожения очень велико. Этот процесс лежит в основе виноделия, пивоварения, производства спирта, хлебопечения. Дрожжи используют и для приготовления кормового белка.

7.2.3. МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

При молочнокислом брожении происходит распад углеводов, а также многоатомных спиртов и белков до молочной кислоты. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы — только молочная кислота или также и другие органические продукты и CO₂ — молочнокислые бактерии

подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные, что отражает различия в путях катаболизма углеводов.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют только одну молочную кислоту, что обусловлено кокковыми и палочковидными молочнокислыми бактериями.

Str. lactus (молочнокислый стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде цепочек. Он неподвижный, грамположительный. Кроме моносахаридов сбраживает лактозу и мальтозу. Оптимальная температура развития — 30–35°C. *Str. cremoris* (сливочный стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде длинных цепочек. Образует летучие кислоты. Используют при производстве кисломолочных продуктов. Бактерии образуют в молоке и молочных продуктах повышенное количество летучих кислот и ароматические вещества, обладают способностью сбраживать лимонную кислоту.

Палочковидные бактерии характеризуются значительным разнообразием форм — от короткой кокковидной до длинной нитевидной. Располагаются в виде единичных клеток, парами или цепочками. Бактерии этого рода разделены на две группы. Представители первой группы хорошо растут при 45°C, слабо развиваются при 20°C и не растут при 15°C. Представители второй группы при развитии в молоке образуют короткие цепочки. Эта группа менее активных молочнокислых палочек; хорошо развиваются при 15–38°C, оптимум для них — 30°C.

Гетероферментативное молочнокислое брожение. Бактерии рода *Leuconostoc* имеют вид сферических клеток, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками. Это факультативные анаэробы, неподвижные, грамположительные, оптимум температуры — 20–30°C. Обычно они встречаются на растениях, в хлебных заквасках. Это небольшие палочки, грамположительные, температурный максимум — около 45°C.

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

Антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к условно патогенным и патогенным микробам обуславливается

действием молочной кислоты, которую они продуцируют, а также образованием антибиотических веществ.

Пропионовокислое брожение осуществляют бактерии рода *Propionibacterium*. Они представляют собой неподвижные полиморфные палочки, образующие булавовидные формы с одним концом закругленным, другим — конусообразным; располагаются одиночно, парами, цепочками; грамположительные, спор не образуют; анаэробы, оптимальные температура роста — 30–37°C, pH 7,0. Встречаются на растениях, в почве, в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Источниками энергии для них служат углеводы, органические кислоты, спирты и другие вещества.

Пропионовокислые бактерии способны сбраживать молочную кислоту, образовавшуюся в результате брожения, вызванного молочнокислыми бактериями. Конечные продукты пропионовокислого брожения — пропионовая и уксусная кислоты, CO₂ и вода:

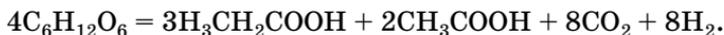


Пропионовокислые бактерии используют для получения витамина B₁₂, который они образуют в значительных количествах.

7.2.4. МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

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

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



Маслянокислое брожение иногда бывает нежелательным. Например, при его развитии в заквашиваемых продуктах, в силосе белковая субстанция разлагается, образуемая масляная кислота ухудшает качество корма, происходит его прогоркание. Животные плохо поедают такой корм. Маслянокислое брожение часто является причиной прогоркания растительных масел и жиров животного происхождения, а также семян сои и подсолнечника.

7.2.5. УКСУСНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Это микробиологический процесс, при котором этиловый спирт окисляется до уксусной кислоты под влиянием уксуснокислых бактерий. Бактериальная природа была установлена в 1868 г. Л. Пастером.

Уксуснокислые бактерии — короткие палочки, подвижные и неподвижные, грамтрицательные, не образуют спор, строгие аэробы. Все виды уксуснокислых бактерий объединены в род *Acebacter*. Типичными представителями являются *A. aceti*, *A. pasterianum* и др. *A. aceti* — короткая палочка, неподвижная, грамтрицательная, располагается цепочками. На поверхности среды (пива, не крепленных спиртом сухих вин) образует пленку. Оптимальная температура роста — 34°C. На поверхности среды образует сухую складчатую пленку. При соединении с йодом приобретает синюю окраску.

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

7.3. КРУГОВОРОТ ФОСФОРА, ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ

Фосфор имеет большое значение в жизнедеятельности организма. Без него не могут синтезироваться белки, он входит в состав ядерного вещества и многих ферментов. В почве содержится в основном в органической, не усвояемой растениями форме и в виде трудноусвояемых минеральных соединений. Органические соединения фосфора попадают в почву вместе с растительными остатками, трупами животных и отмершими микроорганизмами. Они представлены нуклеопр-

теидами, нуклеиновыми кислотами и др. Роль микробов в превращении фосфора сводится к двум процессам: минерализации фосфора, входящего в состав органических веществ, и превращению фосфорнокислых солей из слаборастворимых в хорошо растворимые, доступные для растений.

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

Железобактерии — аэробы, встречаются в болотах, прудах, железистых источниках. В таких водоемах они окисляют закиси железа. В процессе деятельности железобактерий образуется окись железа. Скопление отмерших железобактерий (гидрат окиси железа) образует на дне стоячих водоемов залежи болотной руды.

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

Нитчатые серобактерии — это длинные нити, которые состоят из множества клеток, аэробы, подвижные и неподвижные, окисляют сероводород до серной кислоты.

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

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите цикл превращений азота в природе.
2. Какие микроорганизмы обуславливают аммонификацию (минерализацию) белков?
3. Какие микроорганизмы обуславливают нитрификацию и денитрификацию?
4. Какие микроорганизмы обуславливают аэробное и анаэробное разложение клетчатки?
5. Назовите микроорганизмы, разлагающие целлюлозу в рубце жвачных животных.
6. Охарактеризуйте микроорганизмы, вызывающие спиртовое брожение.
7. Опишите микроорганизмы, вызывающие гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение.
8. Перечислите микроорганизмы, вызывающие масляное брожение.
9. Какие микроорганизмы осуществляют превращение фосфора, железа и серы в природе?

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ
ОСНОВЫ УЧЕНИЯ
ОБ ИНФЕКЦИИ

ГЛАВА 8. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

8.1. ТИПЫ БИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ С МАКРООРГАНИЗМАМИ

Из огромного числа обитающих в природе микроорганизмов только незначительная часть болезнетворна. В процессе многовековой эволюции одни виды микробов, приспособившись к извлечению пищевых ресурсов из неживой природы, до настоящего времени остаются свободноживущими, другие виды постепенно адаптировались к сожительству с животными или растениями, и за счет их получают питательные вещества.

Всякое соžitельство микроорганизма с макроорганизмом представляет собой симбиоз, который характеризуется различными типами биотических взаимоотношений по отношению к клеткам своего хозяина — это мутуализм, комменсализм, паразитизм.

Мутуализм является такой формой соžitельства, когда оба симбионта — хозяин и микроб — получают взаимную выгоду. Некоторые виды бактерий, обитая в кишечнике, продуцируют витамины, которые используются в организме животных для биокаталитических реакций. Кишечная палочка, например, синтезирует и выделяет в окружающую среду витамины группы В, а также витамин К. Бактерии многих других видов продуцируют витамины В₁, В₁₂, а также витамин К.

Примером мутуализма служит соžitельство растений с клубеньковыми бактериями, которые питаются веществами из соков растения (бобовые — горох, вика), а растения, в свою очередь, используют азотистые соединения, синтезированные клубеньковыми бактериями, которые являются фиксаторами азота.

Комменсализм — такая форма сожительства, когда один из симбионтов (в данном случае микроб) живет за счет хозяина, пользуется его защитой, но не причиняет хозяину вреда. Микробы комменсалы (стафилококки, стрептококки) населяют в качестве нормальной микрофлоры кожные покровы и слизистые оболочки животных. Однако следует признать, что комменсализм в этом случае — довольно относительное понятие, потому что среди представителей условно патогенной микрофлоры имеются такие, которые при определенных условиях могут вызывать тяжелые заболевания.

Паразитизм — форма сожительства, когда микробы-паразиты питаются компонентами тканей хозяина, при этом причиняют ему вред, вызывая инфекционную болезнь, и не могут существовать без него. Такие микроорганизмы называются патогенными. Организм хозяина в целом с его морфологическими, физиологическими и защитными свойствами — внешняя среда первого порядка (по Павловскому), к которой паразит адаптируется в процессе эволюции. Эта среда непосредственно влияет на паразитов так же, как и паразиты влияют на хозяина. Окружающая среда в обычном понимании влияет на таких паразитов уже опосредованно, через организм хозяина.

В процессе эволюции адаптация паразитов к хозяину шла по линии специализации, в частности, путем приобретения способности паразитировать в определенных тканях, например, возбудители сибирской язвы, пастереллеза паразитировали в крови, бруцеллы — в плаценте, возбудитель туберкулеза — в лимфоидной ткани, сальмонеллы — в слизистой тонкого кишечника, возбудитель ящура, оспы — в эпидермисе и слизистой оболочке, бешенства — в нервной ткани и т. д. В этом случае речь идет о **тропизме** паразитов, то есть способности избирательно поражать преимущественно те или иные органы и ткани.

Многие болезнетворные микроорганизмы, попадая в организм животного, никак не влияют друг на друга, т. е. между ними нет взаимодействия, такая ситуация называется **нейтрализмом**. Различными могут быть и пространственные отношения между симбионтами. Если один симбионт находится вне клеток другого, то говорят об **эктосимбиозе**, а если внутри клеток — об **эндосимбиозе**. Более крупного из симбионтов называют хозяином.

Микробиологические аспекты инфекции также предусматривают формирование ряда важнейших категорий. Ассоциированные инфекции вызываются двумя или более возбудителями. Ассоциация микроорганизмов — сообщество различных их видов, существующее в естественно или искусственно созданных условиях, например, жизнь анаэробов совместно с аэробами в среде, содержащей свободный кислород. Ассоциация микроорганизмов имеет большое значение при вирусных и микоплазменных инфекциях респираторных органов, в частности у крупного рогатого скота в условиях промышленных животноводческих комплексов.

Синергизм — одинаковые физиологические процессы различных микробных ассоциаций, в результате которых происходит увеличение конечных продуктов.

Сателлизм — стимуляция роста одного микроба продуктами жизнедеятельности другого, который затем становится его спутником.

Антагонизм — противоположное действие, взаимное противодействие органов, лекарственных средств, микробов. Антагонизм микробов — сложное взаимоотношение, когда при совместном развитии популяций бактерии одного вида угнетают развитие бактерий другого вида, а иногда полностью их уничтожают; такое возможно и внутри одного вида. Антагонизм микробов широко используют для профилактики и лечения различных болезней, главным образом желудочно-кишечных. Например, многие штаммы кишечной палочки способны подавлять развитие и уничтожать стрептококки, стафилококки, сибиреязвенную палочку, сальмонеллы, возбудителей злокачественного отека и туберкулеза.

8.2. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ, ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ

Среди многочисленных болезней, которым подвержены человек и животные, инфекционные занимают особое место, так как появлением они обязаны встрече с болезнетворными микробами. На современном этапе развития науки под **инфекцией** (от *лат.* infectio — впитывание, заражение) понимают состояние, при котором развивается эволюционно сложив-

шийся комплекс биологических реакций взаимодействия макроорганизма и патогенных микробов.

Состояние инфекции, как всякого биологического процесса, динамично. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют **инфекционным процессом**. С одной стороны он включает внедрение, размножение и распространение патогенного микроба в организме, с другой — реакцию организма на это действие. Данные реакции выражаются в биохимических, морфологических, функциональных и иммунологических изменениях, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма.

Наиболее яркой формой проявления инфекционного процесса является инфекционная болезнь, которая обусловлена патологическими процессами, вызванными действием возбудителя, и характеризуется определенной клинической картиной. Она имеет ряд особенностей, отличающих ее от болезней неинфекционного характера:

1) инфекционную болезнь вызывают определенные специфические возбудители;

2) больной организм сам становится источником возбудителя инфекции, который, выделяясь в окружающую среду, заражает здоровых животных, то есть инфекционной болезни присущи заразность, микробоносительство;

3) в больном организме происходят процессы образования специфических антител, благодаря этому организм после выздоровления становится в большинстве случаев иммунным, т. е. невосприимчивым к повторному заражению тем же возбудителем.

Инфекционный процесс может протекать бессимптомно, скрыто, латентно (бессимптомная, или скрытая, инфекция). Следствием скрытой инфекции может быть иммунизирующая субинфекция — состояние, когда патогенные микробы, проникая в организм животного в небольших дозах и неоднократно, вызывают иммунобиологические реакции, выработку специфических антител и защитных механизмов, но сами при этом погибают. У таких животных не выявляют функциональных расстройств, а после убоя не обнаруживают патологических изменений в органах и тканях.

Инфекционный процесс характеризуется циклическим развитием и включает следующие периоды: инкубационный,

продромальный, клинический (разгар болезни), выздоровление (реконвалесценция).

Инкубационный период — определенный промежуток времени от момента проникновения микроба в организм до появления первых признаков болезни. При разных инфекционных болезнях он неодинаков и составляет от нескольких дней, месяцев до нескольких лет.

Продромальный период (период предвестника болезни) — появление первых, не всегда специфических для данной болезни симптомов: повышение температуры тела, слабость, угнетение, потеря аппетита. Продолжительность его от нескольких часов до четырех дней.

Период развития основных клинических признаков (разгар болезни) — проявление основных характерных для данной инфекционной болезни признаков (при ячюре — афты, при бешенстве — параличи, при ботулизме — расслабление мышц), а также угнетение, высокая температура, нарушение дыхания, пищеварения и др.

Период выздоровления — постепенное восстановление физиологических функций организма. Клиническое выздоровление при многих инфекционных болезнях не совпадает по времени с освобождением организма от возбудителя.

Иногда микробы, проникнув в организм, остаются только в поврежденной ткани и, размножаясь, выделяют токсины, которые, проникая в кровь, вызывают более тяжелые формы отравления. Такой процесс называется **токсемией**.

Бактериемия — состояние, когда микробы находятся в крови временно и не размножаются в ней, а посредством ее только переносятся в другие чувствительные ткани и органы.

Сепсис, или септицемия, — процесс, характеризующийся размножением микробов в крови и локализацией их в различных органах и тканях организма. Для него характерны быстрота и нередко смертельный исход. Септицемия отмечается при многих инфекционных болезнях: сибирской язве, роже свиней, колибактериозе и др. Сепсис, вызываемый разными возбудителями, характеризуется в самом начале одинаковой клинической картиной, что приводит к затруднению постановки диагноза.

Если в результате распространения патогенных микробов по лимфатическим и кровеносным путям в отдельных органах

возникают гнойные очаги, процесс называется **септикопиемией**. Такой вид инфекции наблюдается при мытье лошадей, вызываемом стрептококком.

По характеру проявления инфекционные болезни делятся на кишечные (колибактериоз, сальмонеллез), респираторные (туберкулез, оспа), инфекции кожных покровов и слизистых оболочек (столбняк, сибирская язва, ящур). Возбудители кишечных инфекций передаются алиментарным путем (корм, вода, предметы ухода). Инфекции дыхательных путей распространяются воздушно-капельным, реже — воздушно-пылевым путем. Для кровяных инфекций характерен трансмиссивный путь передачи через кровососущих насекомых (вши, клещи, комары, блохи и пр.). Возбудители инфекций кожных покровов и слизистых оболочек передаются через предметы обихода, прямым контактом, например посредством укуса (бешенство) или половым путем (кампилобактериоз).

По характеру возникновения выделяют экзогенные и эндогенные инфекции. В случае, когда заражение происходит в результате попадания патогенных микробов извне, говорят об **экзогенной** (гетерогенной) инфекции (ящур, сибирская язва, чума). Когда условно-патогенные микробы, находящиеся в организме, не проявляют свою патогенность в силу высокой резистентности макроорганизма, а при ослаблении его резистентности (истощение, авитаминоз, охлаждение) активизируют свои патогенные свойства, вызывая болезнь, говорят об **эндогенной (спонтанной, аутоинфекции) инфекции**.

Если организм переболел какой-либо болезнью и освободился от возбудителя, но не приобрел стойкого иммунитета и при повторном заражении этим же возбудителем повторно заболевает, говорят о **реинфекции**.

Повторное заражение организма, у которого не закончилось основное заболевание, называется **суперинфекцией**. Она встречается при многих инфекционных болезнях, протекающих в острой и хронической формах.

Иногда болезнь протекает без клинических признаков вследствие наступившего равновесия между макро- и микроорганизмом.

Возврат симптомов той же болезни называют **рецидивом**, а периоды между рецидивами — **ремиссиями**. Рецидивы характерны

для инфекционной анемии лошадей, сальмонеллезов и других инфекционных болезней.

Если болезнь вызвана одним возбудителем, то ее называют простой, или **моноинфекцией**. Когда в организм животного проникают два и более возбудителя, вызывающих болезнь, то говорят о **смешанной инфекции**. Например, крупный рогатый скот может одновременно болеть туберкулезом и бруцеллезом. Наличие смешанных инфекций усложняет организацию противоэпизоотических мероприятий и вызывает иногда значительные трудности при диагностике болезней.

Вторичная, или секундарная, инфекция возникает вслед за первичной (основной) инфекцией. Возбудителями вторичных инфекций являются условно патогенные микробы. Например, при чуме свиней вторичная инфекция — пастереллез. Возбудитель пастереллеза обнаруживают у здоровых свиней в дыхательных путях, при ослаблении организма (например, заболевании чумой) он вызывает вторичную инфекцию.

После переболевания инфекционной болезнью в одних случаях организм полностью освобождается от возбудителя в результате образования иммунитета, однако иногда возбудитель длительное время сохраняется в макроорганизме. Такое состояние называют **микробоносительством** (сальмонеллез, пастереллез, туберкулез и др.). Животные-микробоносители представляют опасность как источники возбудителя инфекции.

Различают микробоносительство, которое не связано с предшествующим заболеванием, не сопровождается иммунологической перестройкой и его выявляют только при бактериологическом исследовании. Такое состояние закономерно до момента активации условно патогенной микрофлоры. Так, например, резистентные животные могут быть носителями сальмонелл, пастерелл, возбудителя рожи свиней и др. Возможно также кратковременное носительство возбудителя, не свойственного животным данного вида, например вирус ИНАН лошадей у свиней, вирус чумы свиней у собак. Следует помнить, что здоровые микробоносители могут служить источником возбудителя инфекции.

При неблагоприятном исходе инфекционной болезни животное может погибнуть очень быстро или через продолжительное время в результате постепенного ослабления и истощения. В связи с этим **по форме течения и клиническому проявлению**

инфекционного заболевания различают сверхострое (молниеносное), острое, подострое, хроническое, abortивное, типичное и атипичное. **Сверхострое** течение длится несколько часов, при этом типичные клинические признаки не успевают развиваться из-за гибели животного. **Острое** течение болезни продолжается от одного до нескольких дней, для него характерно проявление типичных клинических признаков. **Подострое** течение болезни более продолжительное, клинические признаки тоже типичны, но выражены менее четко. При **хроническом** течении болезнь может затянуться на месяцы и годы, при этом клинические признаки слабо выражены, а временами вообще отсутствуют. Такое течение болезни принимает при снижении вирулентности возбудителя и достаточно высокой резистентности организма животных. Если типичное развитие болезни внезапно останавливается и наступает выздоровление, то течение болезни называют **abortивным (атипичная форма)**. Большинство инфекционных болезней характеризуется наличием определенных, явно выраженных клинических признаков. Такая форма болезни называется **типичной**. Инфекционный процесс может быстро заканчиваться выздоровлением животного, это доброкачественное течение. При пониженной естественной резистентности организма и наличии высоковирулентного возбудителя болезнь может принимать **злокачественное** течение, характеризующееся высокой летальностью.

8.3. ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для возникновения инфекционной болезни необходимы следующие условия:

- микроб должен быть достаточно вирулентным;
- необходимо внедрение определенного количества микробов;
- микробы должны проникнуть в организм через наиболее благоприятные для них ворота инфекции и достичь восприимчивых тканей;
- организм хозяина должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни;
- условия среды должны благоприятствовать взаимодействию между микробом и организмом.

Место проникновения патогенных микробов в организм называется **входными воротами инфекции**.

Судьба патогенных микробов, попавших в организм, может быть различной в зависимости от состояния организма и вирулентности возбудителя. Некоторые микробы, попав с током крови в определенные органы, оседают (задерживаются) в их тканях, размножаются и вызывают заболевание, например возбудитель туберкулеза в легочной ткани. Любая инфекционная болезнь независимо от клинических признаков и локализации микробов в организме представляет собой заболевание всего организма.

Инфекционная болезнь возникает только при наличии возбудителя, обладающего патогенностью вообще и вирулентностью в частности. Одинаковы ли эти понятия?

Патогенность — видовой генетический признак возбудителя, его потенциальная способность вызывать при благоприятных условиях специфический инфекционный процесс. По этому признаку все существующие микроорганизмы подразделяют на патогенные, условно патогенные и сапрофиты. Фактически все возбудители инфекционных болезней являются патогенными, но чтобы вызвать инфекционную болезнь, они должны обладать вирулентностью. Нельзя ставить знак равенства между патогенностью и вирулентностью: микроорганизм считается вирулентным, если он при внедрении в организм животного даже в исключительно малых дозах вызывает развитие инфекционного процесса. Никто не сомневается в патогенности сибиреязвенной палочки, между тем среди культур этого микроба изредка, но встречаются авирулентные штаммы, не способные вызвать заболевания у животных. Бактерии рожи свиней принадлежат к патогенному виду, но немало их разновидностей было выделено из организма совершенно здоровых свиней и рыб.

Вирулентность — это степень патогенности конкретного микроорганизма, то есть индивидуальный признак, который можно измерить. За единицу измерения вирулентности условно приняты летальная и инфицирующая дозы. **Минимальная смертельная доза** — это наименьшее количество живых микробов или их токсинов, вызывающее за определенный срок гибель большинства взятых в опыт животных определенного вида. Но поскольку индивидуальная чувствительность животных к патогенному микробу (токсину) различна, то была введена

безусловно смертельная доза DCL (*Dosis certa letalis*), вызывающая гибель 100% зараженных животных. Наиболее точная единица вирулентности — это **средняя летальная доза LD50**, т. е. наименьшая доза микробов (токсинов), убивающая половину животных в опыте. Для установления летальной дозы принимают во внимание способ введения возбудителя, возраст подопытных животных, а также массу: белые мыши — 16–18 г, морские свинки — 350 г, кролики — 2 кг. Таким же образом определяют **инфицирующую дозу (ID)**, т. е. количество микробов или их токсинов, которое вызывает соответствующую инфекционную болезнь.

Высоковирулентные микроорганизмы способны вызывать болезни у животных или человека даже в минимальных дозах. Известно, что 2–3 микобактерии туберкулеза при введении в трахею морской свинки вызывают туберкулез со смертельным исходом. Вирулентные штаммы сибиреязвенной бациллы в количестве 1–2 клеток могут вызвать смерть у морской свинки, белой мыши и даже крупного животного.

У одного и того же микроорганизма вирулентность может значительно колебаться в зависимости от ряда биологических, физических и химических факторов, воздействующих на него. Вирулентность микроорганизма можно усилить или ослабить искусственными приемами.

Ослабление вирулентности микроорганизмов вызывает длительное выращивание культур вне организма на обычных питательных средах, при максимальной температуре (опыты Л. Пастера и Л. С. Ценковского), действие химических веществ — добавление к культурам антисептиков (двухромовокислый калий, карболовая кислота, щелочь, сулема, желчь и т. д.).

Пассирование (пассаж — последовательное проведение) возбудителя какой-либо инфекционной болезни через определенный вид животного от зараженного к здоровому, например возбудителя рожи свиней через организм кролика, ослабляет вирулентность для свиней, но усиливает ее для самих кроликов. Действие бактериофага (биологический фактор) может привести к ослаблению вирулентности микроорганизмов.

Усиление вирулентности под действием протеолитических ферментов происходит у *C. perfringens* при естественной ассоциации с возбудителями гниения (например, сарцинами) или

при искусственном воздействии ферментом животного происхождения (например, трипсином). Связан этот эффект со способностью протеаз активизировать протоксины, то есть предшественники эпсилонтоксина типов В и D.

Вирулентность микроорганизмов связана с токсигенностью и инвазивностью.

Токсигенность — способность микроба образовывать токсины, которые вредно действуют на макроорганизм путем изменения его метаболических функций.

Инвазивность — способность микроба преодолевать защитные барьеры организма, проникать в органы, ткани и полости, размножаться в них и подавлять защитные средства макроорганизма. Инвазионные свойства патогенных бактерий обеспечиваются за счет микробных ферментов (гиалуронидаза), капсул и других химических компонентов микробов.

8.3.1. ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

Под факторами патогенности понимают приспособительные механизмы возбудителей инфекционных болезней к меняющимся условиям макроорганизма, синтезируемые в виде специализированных структурных или функциональных молекул, при помощи которых они участвуют в осуществлении инфекционного процесса. По функциональному значению их разделяют на четыре группы:

I — микробные ферменты, деполимеризующие структуры, препятствующие проникновению и распространению возбудителя в макроорганизме;

II — поверхностные структуры бактерий, способствующие закреплению их в макроорганизме;

III — поверхностные структуры бактерий, обладающие антифагоцитарным действием;

IV — факторы патогенности с токсической функцией.

При этом факторы патогенности первых трех групп обуславливают инвазионность, последней — токсичность патогенных микроорганизмов.

Ферменты I группы

Гиалуронидаза. Повышает проницаемость тканей макроорганизма. Кожа, подкожная клетчатка и межмышечная клет-

чатка содержат мукополисахариды и гиалуроновую кислоту, которые замедляют проникновение через эти ткани чужеродных веществ, даже в жидком состоянии. Гиалуронидаза способна расщеплять мукополисахариды и гиалуроновую кислоту, в результате чего повышается проницаемость тканей и микроорганизм свободно продвигается в глуболежащие ткани и органы животного организма. Продуцируют этот фермент бруцеллы, гемолитические стрептококки и другие микроорганизмы.

Фибринолизин разжижает плотные сгустки крови (фибрин). Некоторые штаммы гемолитического стрептококка, стафилококков, иерсиний синтезируют фибринолизин. Гиалуронидаза и фибринолизин увеличивают способность патогенных микробов генерализировать процесс и устраняют химикомеханические препятствия на пути внедрения микробов в глубь тканей.

Нейраминидаза. Отщепляет от различных углеводов связанные с ними гликозидной связью концевые сиаловые кислоты, которые деполимеризуют соответствующие поверхностные структуры эпителиальных и других клеток организма, разжижают носовой секрет и муцинозный слой кишечника, синтезируют пастереллы, иерсинии, некоторые клостридии, стрепто- и диплококки, вибрионы и др.

ДНК-азы (дезоксирибонуклеаза) деполимеризуют нуклеиновую кислоту, обычно проявляющуюся при разрушении лейкоцитов в воспалительном очаге на месте внедрения микробов. Продуцируют фермент стафилококки, стрептококки, клостридии и др.

Коллагеназа. Гидролизует входящие в состав коллагена, желатина и других соединений пептиды, содержащие пролин. В результате расщепления коллагеновых структур наступает расплавление мышечной ткани. Вырабатывают фермент клостридии злокачественного отека.

Коагулаза. Свертывает цитратную или оксалатную кровяную плазму человека и животных. Продуцируют фермент вирулентные штаммы золотистого стафилококка, некоторые штаммы кишечной палочки и сенной бациллы. Свертывание цитратной крови происходит вследствие выработки перечисленными микроорганизмами фермента коагулазы.

Ферменты II группы

Включают патогенные микроорганизмы, которые благодаря наличию ворсинок, жгутиков, пилей, рибитотейхоевой и

липотейхоевой кислот, липопротеидов и липополисахаридов способны закрепляться в макроорганизме. Это явление названо адгезией, то есть способностью микроба адсорбироваться (прилипнуть) на чувствительных клетках. Адгезивность хорошо выражена у эшерихий (штаммы К-88, К-99), которые продуцируют соответствующие белковые антигены, позволяющие бактериям прикрепляться к слизистой оболочке тонких кишок, накапливаться в больших количествах, продуцировать токсины и таким образом поражать макроорганизм.

Ферменты III группы

Включают бактерии, содержащие поверхностные структуры, обладающие антифагоцитарным действием. К ним относятся А-протеин золотистого стафилококка, М-протеин пиогенного стрептококка, антиген сальмонелл, липиды кордфактора микобактерий туберкулеза и др. Механизм антифагоцитарного действия этих микробов объясняют не токсигенностью, а способностью блокировать антитела (опсонины) или отдельные фракции комплемента (например, С₃), способствующие фагоцитозу.

Бациллы сибирской язвы, пневмококки могут синтезировать выраженную капсулу, хорошо заметную в мазках-отпечатках, приготовленных из свежего патологического материала или из культур, выращенных на сывроточных средах. Доказано, что капсульное вещество — полисахарид у пневмококков, полипептидаза глутаминовой кислоты у сибиреязвенной бациллы — не простая механическая преграда для бактерицидных соков организма, химических, лекарственных веществ, антибиотиков; капсула и ее вещество защищают бактерии от перегрева. Капсула подавляет фагоцитоз бактерий, обеспечивает их устойчивость к антителам и усиливает их инвазионные свойства. Например, капсулообразующие сибиреязвенные бациллы не подвергаются фагоцитозу, в то время как бескапсульные варианты легко фагоцитируются.

Данный фактор патогенности сибиреязвенного микроба настолько важен, что его используют в качестве критерия для оценки степени вирулентности возбудителя сибирской язвы. В медицинской и ветеринарной практике успешно используют против сибирской язвы вакцины (СТИ и ВГНКИ), представляющие собой взвесь жизнеспособных спор бескапсульных штаммов сибиреязвенных бацилл.

К этой же группе факторов патогенности можно отнести нетоксичные неантигенные капсульные структуры некоторых стрептококков (например, группы А), содержащие гиалуроновую кислоту. Ввиду общности с межклеточным веществом макроорганизма они, вероятно, не распознаются хозяином и остаются нефагоцитированными.

Ферменты IV группы

Включают токсины. Среди токсинов микробного происхождения различают экзо- и эндотоксины (табл. 1).

Экзотоксины — высокоактивные яды, выделяемые микроорганизмом на протяжении его жизни в качестве продуктов обмена в окружающую среду (организм животного, пробирка с культурой микроба). **Эндотоксины** менее ядовиты по сравнению с экзотоксинами, образуются в результате распада микробной клетки. Следовательно, эндотоксины представляют собой фрагменты или отдельные химические компоненты микробных клеток.

Некоторые микроорганизмы (стрептококки, стафилококки) продуцируют экзотоксины (**гемолизины**), растворяющие

Таблица 1

Сравнительная характеристика микробных токсинов

Экзотоксины	Эндотоксины
Легко диффундируют в окружающую среду из микробных клеток	Прочно связаны с неразрушенным телом микробной клетки
Обладают высокой активностью. Избирательно поражают отдельные органы и ткани	Менее токсичны. Избирательное действие не наблюдается или слабо выражено
Выражены антигенные свойства; вызывают образование в организме антитоксинов	Слабые антигены; антисыворотки обладают невысокой активностью
Протеины, обладают свойствами ферментов; некоторые получены в кристаллическом состоянии	Протеины или различные химические комплексы — глюкополипиды, полисахаридолипопротеины
Термолабильны	Термостабильны
Неустойчивы к протеолитическим ферментам (38...40°C)	Устойчивы к действию протеолитических ферментов
Под действием 0,3...0,4%-го формалина переходят в анатоксины	Более устойчивы к формалину

эритроциты крови. Бактерийные гемолизины следует отличать от иммуногемолизин, которые возникают в организме и обнаруживаются в сыворотке крови животных после иммунизации эритроцитами.

Различают α -, β - и δ -бактерийные гемолизины; так, α -гемолизины вызывают гематометаморфоз железа эритроцитов (переход гемоглобина в метгемоглобин), в результате образуются соединения зеленого цвета, которые окрашивают кровяной агар вокруг колонии растущего микроба в зеленый или грязно-зеленый цвет (этим свойством обладает зеленающий стрептококк).

β -гемолизины целиком растворяют эритроциты крови, нарушая адсорбционную связь между гемоглобином и стромой эритроцитов. Поэтому кровь гемолизируется, становится прозрачной, лаковой. К микроорганизмам, вырабатывающим гемолизины, относятся возбудители листериоза, гемолитические стрептококки, стафилококки, которые формируют на кровяном агаре вокруг колоний бесцветную прозрачную гемолитическую зону, иногда значительно превышающую диаметр колоний.

δ -гемолизин разрушает эритроциты человека и некоторых животных. Вырабатывается патогенными стафилококками. Отличие бактериальных гемолизин заключается в неодинаковом механизме повреждающего действия.

Некоторые грамположительные кокки (стафилококки, стрептококки) могут вырабатывать особый вид экзотоксина — **лейкоцидин**, парализующий активность лейкоцитов и разрушающий их.

Нейротоксины обладают выраженной тропностью к центральной нервной ткани (тетанолизин — токсин столбнячного микроба); периферической ткани (ботулинические нейротоксины) и отдельным звеньям симпатической нервной системы, нейрогуморальной системе и др.

Энтеротоксины — белки, вызывающие поражение желудочно-кишечного тракта у животных. Способность энтеротоксинов повышать проницаемость сосудов и выход жидкости, ионов натрия и хлоридов кальция в просвет кишечника приводит к нарушению обменных процессов и развитию диарей. Энтеротоксины (экзотоксины) обнаружены у эшерихий, стафилококков и других микроорганизмов.

Некротоксин (гистотоксин) вызывает омертвление ткани, тормозит теплорегуляцию, понижая температуру тела. Это полисахаридолипоидные экзокомплексы, вырабатываемые сальмонеллами, коринебактериями, кокками, анаэробами, нередко изменяют содержание сахара в крови, изъязвляют слизистую оболочку тонких кишок, что обуславливает появление кровавых диарей. Гистотоксины при внутривенном введении приводят к деструкции клеток системы мононуклеарных фагоцитов или активации протеолитических ферментов.

Таким образом, факторы вирулентности приводят основные системы организма к дисфункции, в силу чего последний погибает. Однако не каждый вирулентный штамм патогенных микроорганизмов обладает всей суммой указанных факторов вирулентности, одного-двух из них иногда бывает достаточно, чтобы ослабить реактивность животного и вызвать его гибель.

8.4. РОЛЬ МАКРООРГАНИЗМА И УСЛОВИЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

При изучении инфекционных болезней какое-то время животный организм рассматривали как пассивную арену деятельности патогенного микроба, который непостоянен в своих свойствах и вызывает инфекцию при любых условиях. Состояние же макроорганизма и влияние факторов окружающей среды во внимание не принимали. Однако различия в восприимчивости животных и человека даже к таким опаснейшим заразным болезням, как чума и холера, указывали на ошибочность такого мнения. Работы Л. Пастера и особенно И. И. Мечникова убедительно показали, что инфекционный процесс зависит не только от вирулентности и дозы микроба-возбудителя, но и от состояния защитных сил макроорганизма, которое определяется многими факторами: реактивностью (способностью проявлять защитно-приспособительные функции), конституцией и кондицией, состоянием ЦНС и др. Естественная резистентность, в свою очередь, во многом зависит от

условий окружающей среды. Вызванное любой причиной ослабление организма способствует развитию инфекции.

Голодание. Один из сильнейших факторов, снижающих устойчивость организма против заражения. Систематическое недоедание обычно ведет к появлению массовых болезней среди людей и животных. Если в кормах недостает того или иного питательного вещества, это может усилить патологическое состояние организма, способствовать развитию инфекционной болезни. Известно, например, что отсутствие в кормах витаминов, солей фосфора и кальция делает организм высокомо-лочных коров, даже при обильном кормлении, очень восприимчивым к заражению туберкулезом и бруцеллезом. Достаточное и полноценное кормление повышает устойчивость организма против инфекционных болезней, усиливает его способность противостоять вредным воздействиям патогенных микробов.

Водный режим. Недостаточное потребление животными воды снижает сопротивляемость их организма к инфекционным болезням. Экспериментально (путем искусственного водного голодания) удалось ослабить организм собак и заразить их возбудителем сибирской язвы, тогда как в обычных условиях они малочувствительны к этой инфекции.

Температура. Чрезмерно высокая или очень низкая температура может уменьшить устойчивость организма к инфекции. При переохлаждении, особенно у молодняка, проявляются простудные и диарейные заболевания (пневмонии, гастроэнтериты у поросят). У животных, вакцинированных при высоких температурах, напряженность иммунитета заметно снижается.

Утомление. Переутомление животных, вызванное чрезмерной эксплуатацией, может снизить устойчивость против инфекции. Известно много случаев обострения скрытой инфекции после усиленной эксплуатации животных. Например, сеп, инфекционная анемия лошадей, пастереллез.

Нарушение санитарно-зооигиенических норм содержания животных. Высокая влажность, отсутствие вентиляции, недостаточная освещенность помещений и др. также ведут к снижению общей сопротивляемости организма животных.

На устойчивость организма влияют **возраст и порода животных.** Телята до 3-месячного возраста почти никогда не боле-

ют бруцеллезом, поросята до 2–3 мес. реже болеют рожей свиной. Существуют болезни, которыми болеет только молодняк. Например, колибактериозом заболевает только молодняк в первые дни после рождения; эмфизематозный карбункул поражает телят в возрасте от 3 мес. до 4 лет.

Контрольные вопросы и задания

1. Укажите формы биотического взаимоотношения микроорганизмов.
2. Дайте определения инфекции, инфекционной болезни и инфекционного процесса.
3. Дайте определение патогенности, вирулентности микробов.
4. Что означают термины «реинфекция», «вторичная, или секундарная, инфекция»?
5. Какие процессы обозначаются терминами «сепсис», «септицемия», «бактериемия»?
6. Каковы пути внедрения и распространения патогенных микроорганизмов в организме?
7. Дайте сравнительную характеристику экзо- и эндотоксинов и ферментов, выделяемых микроорганизмами.

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ
**ОСНОВЫ
ИММУНОЛОГИИ**

ГЛАВА 9. ИММУНИТЕТ. КЛАССИФИКАЦИЯ ИММУНИТЕТА

Иммунитет — способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки генетической чужеродности.

Организм человека и животных весьма точно дифференцирует «свое» и «чужое», обеспечивая, таким образом, защиту от внедрения не только патогенных микробов, но и чужеродных веществ. Следовательно, главное назначение иммунитета состо-

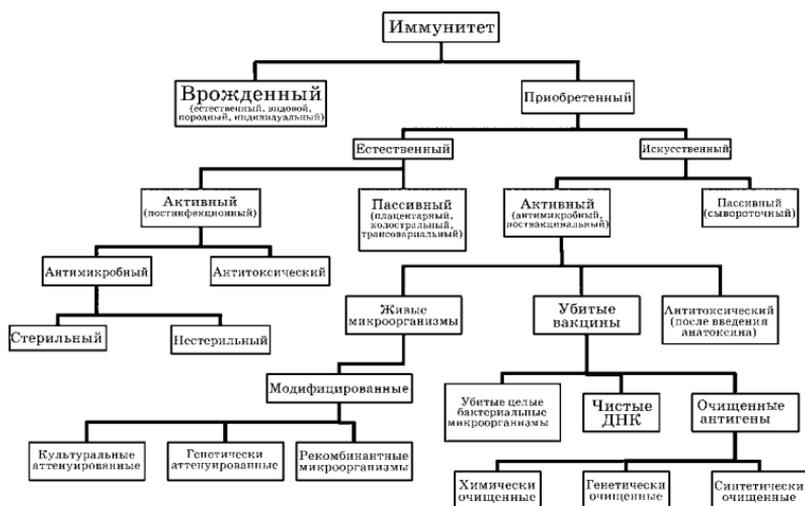


Рис. 14
Классификация различных видов иммунитета

ит в распознавании «своего» и «чужого», что жизненно важно. Поступление во внутреннюю среду организма веществ с признаками чужеродной информации (макромолекул белков, полисахаридов и др.) грозит нарушением структурного и химического состава этого организма. Количественное и качественное «постоянство» внутренней среды, называемое гомеостазом, обеспечивает процессы саморегулирования во всех живых системах. Иммуни́тет — одно из проявлений гомеостаза. В этой связи иммунитет является свойством всего живого: человека, животных.

Система органов и клеток, осуществляющая реагирование против чужеродных субстанций, получила название **иммунной системы организма**. Она распределена по всему организму, клетки постоянно рециркулируют по всему телу через кровоток, она обладает способностью вырабатывать сугубо специфические молекулы антител, различные по своей специфике в отношении каждого антигена.

По происхождению различают два вида иммунитета: врожденный и приобретенный (рис. 14).

9.1. ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Врожденный иммунитет (естественный, видовой, наследственный, генетический) — это невосприимчивость к инфекционным агентам, детерминированная в геноме и проявляемая количеством и порядком расположения ганглиозитов определенного типа на поверхности мембран клеток. Этот вид иммунитета свойствен животным определенного вида к определенному возбудителю инфекции и передается из поколения в поколение. Например, лошади не болеют ящуром, крупный рогатый скот — сапом, собаки — чумой свиней, животные — сифилисом и т. д. В основе механизмов врожденного иммунитета к определенным возбудителям лежит отсутствие в клетках организма рецепторов и субстратов, необходимых для адгезии и размножения возбудителя, то есть наличие веществ, блокирующих размножение патогенных микробов. Последние не могут размножаться в организме, и заболевание не возникает. Например, бруцеллы могут размножаться в плаценте только тех видов животных, которые содержат углевод и эритритол.

Врожденный иммунитет весьма прочный, но не абсолютный. Так, в естественных условиях куры не болеют сибирской язвой, однако Пастер заразил кур сибиреязвенной бациллой после искусственного переохлаждения, погружая их конечности в холодную воду. Мечникову удалось вызвать экспериментальный столбняк у лягушки (весьма устойчивой к столбнячному токсину) при перенагревании ее в термостате.

Врожденной резистентностью в основном обладают взрослые животные, у новорожденных же во многих случаях видовая устойчивость отсутствует. Например, кролики-сосуны и мышата чувствительны к заражению вирусом ящура. Весьма чувствительны к вирусам и бактериям развивающиеся куриные эмбрионы, что на практике используют для получения вакцин.

Следует учитывать, что животные, не заболевая определенной инфекционной болезнью, могут быть носителем возбудителя и представлять опасность для других видов. Например, человек может быть носителем вируса чумы собак.

Важно отметить, что естественная невосприимчивость — это не только видовой признак, среди восприимчивых к определенным видам микробов существуют породы, популяции и линии животных, отличающиеся высокой устойчивостью к данному возбудителю. Например, при высокой чувствительности овец к сибирской язве алжирские овцы отличаются высокой к ней устойчивостью. Свиньи йоркширской породы по сравнению с другими породами устойчивее к роже свиней. Куры породы белый леггорн более устойчивы к пуллорозу, чем птицы пород красный род-айленд и плимутрок.

9.2. ПРИОБРЕТЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Приобретенный иммунитет (специфический) — это устойчивость организма только к определенному возбудителю болезни. Характерная особенность приобретенного иммунитета — его специфичность. Приобретенный иммунитет подразделяют на естественный и искусственный.

Естественно приобретенный иммунитет возникает у животных, переболевших без клинически выраженных симптомов. Во многих случаях в организм животного систематичес-

ки попадают дозы возбудителя меньше той, которая может вызвать заболевание. В этом случае происходит скрытая иммунизация, которая у животных, достигших определенного возраста, создает активный иммунитет к определенному возбудителю. Такое явление называют **иммунизирующей субинфекцией**.

Естественно приобретенный иммунитет делят на активный и пассивный. Активный (постинфекционный) иммунитет появляется после естественного переболевания животного. Пассивный иммунитет — это иммунитет новорожденных, приобретенный ими за счет поступления материнских антител через плаценту (трансплацентарный) либо после рождения через кишечник с молозивом (колостральный или молозивный). У птиц материнские антитела передаются с лецитиновой фракцией желтка (трансовариальный). Важно отметить, что насыщение кровотока новорожденных животных (жвачных, лошадей, свиней) иммунными фракциями происходит в основном колостральным путем. В связи с этим различают естественно и искусственно вызванный колостральный иммунитет. Естественный колостральный иммунитет обусловлен антителами, естественно выработанными в организме матери под воздействием различных антигенов окружающей среды, искусственный — специфическими антителами, выработанными при искусственной иммунизации организма матери определенными антигенами (вакцинами) против определенного возбудителя болезни.

Молозиво неиммунизированных коров обладает бактериостатическими и антитоксическими свойствами в отношении многих патогенных микроорганизмов кишечной палочки, сальмонелл, стафилококков и др. Воспринятые с молозивом иммуноглобулины (антитела) в кишечнике новорожденных телят абсорбируются и неизменными проходят через стенку кишечника в лимфатическую систему, а затем в кровеносное русло. Отметим, что у домашних животных кишечник проницаем для молозивных антител лишь в первые 24–36 ч, поэтому молозиво новорожденный должен получить как можно раньше и больше с момента рождения.

Естественно приобретенный активный иммунитет может сохраняться 1–2 года, но в некоторых случаях — пожизненно

(например, у собак, переболевших чумой; у овец, переболевших оспой). Естественно приобретенный пассивный иммунитет обеспечивает состояние невосприимчивости от нескольких недель до нескольких месяцев.

Искусственно приобретенный иммунитет, в свою очередь, также подразделяют на активный и пассивный. Активный (поствакцинальный) возникает в результате иммунизации животных вакцинами. Вакцинный иммунитет в организме развивается через 7–14 сут после вакцинации и сохраняется от нескольких месяцев до 1 года и более. Пассивный иммунитет создается при введении в организм иммунной сыворотки, содержащей специфические антитела против определенного возбудителя болезни. Пассивный иммунитет можно создать и при введении сывороток крови животных реконвалесцентов (переболевших данной болезнью), например при ящуре. Пассивный иммунитет, как правило, длится не более 15 сут.

Иммунитет также принято классифицировать по направленности действия защитных механизмов организма на микроорганизмы и их продукты жизнедеятельности (токсины):

- антибактериальный иммунитет — защитные механизмы направлены против патогенного микроба, в результате предотвращается размножение и распространение микроба;
- противовирусный иммунитет — обусловлен выработкой организмом противовирусных антител и механизмами точной защиты;
- антитоксический иммунитет — бактерии не разрушаются, но организм больного животного вырабатывает антитела, эффективно нейтрализующие токсины.

Иммунитет при протозойных и гельминтозных заболеваниях направлен на обезвреживание и уничтожение возбудителей болезней.

Выделяют также **местный (локальный) иммунитет**. Это понятие впервые было введено А. М. Безредка в 1925 г. Логическим выводом из теории местного иммунитета послужило изыскание методов локальной иммунизации тканей и органов, представляющих собой ворота инфекции, то есть первого защитного барьера против инфекционного агента. В этой связи в практической деятельности стали широко применять аэрогенный и пероральный способы иммунизации.

Если после перенесенной болезни организм освобождается от возбудителя, сохраняя при этом состояние невосприимчивости, то такой иммунитет называют стерильным. Однако при многих инфекциях иммунитет сохраняется только до тех пор, пока в организме находится возбудитель болезни. В этом случае говорят об инфекционном или нестерильном иммунитете (премуниция).

В зависимости от механизмов защиты организма различают гуморальный и клеточный иммунитет. **Гуморальный иммунитет** включает реакции и механизмы иммунного ответа, обусловленные выработкой в зараженном организме специфических антител, **клеточный** — обусловленные образованием специфических реагирующих с возбудителем (антигеном) Т-лимфоцитов.

Гуморальный иммунитет — одна из форм приобретенного иммунитета, он играет важную роль в противоинфекционной защите организма и обуславливается специфическими антителами, выработанными в ответ на чужеродный антиген. При гуморальном иммунитете присутствуют в крови специфические антитела, что наиболее ярко проявляется в нейтрализации бактериальных токсинов антитоксинами (при столбняке, ботулизме, анаэробных инфекциях), в реакции нейтрализации вирусов вируснейтрализующими антителами в сенсбилизации бактерий к фагоцитозу и бактериолизу. Считают, что патогенные микроорганизмы, размножающиеся в организме внеклеточно, как правило, обуславливают гуморальный иммунитет.

Клеточный иммунитет по ряду признаков принципиально отличается от гуморального прежде всего тем, что эффекторными элементами служат лимфоциты, а не гуморально-плазматические клетки. Эту форму реакции организма на антиген в связи с особенностями клеточного иммунного ответа принято называть **клеточным иммунитетом**.

Термин «клеточный иммунитет» в иммунологической литературе употребляют в качестве синонима другого термина — «повышенная чувствительность замедленного типа», так как классические проявления (феномен Коха, реакция на туберкулез) развиваются в более поздние сроки, чем повышенная чувствительность немедленного типа (анафилаксия).

Клеточный иммунитет имеет особое значение при инфекциях, вызванных многими вирусами, бактериями, грибами, при отторжении трансплантата, в противоопухолевом иммунитете и при аутоиммунных заболеваниях. Например, вирусы, бактерии, грибы, находящиеся внутри клетки, могут быть уничтожены только при помощи клеточного иммунитета.

В механизме клеточного иммунитета различают три фазы:

- 1) распознавание антигена;
- 2) образование эффекторных клеток и клеток памяти;
- 3) эффекторная фаза, обусловленная действием клеток-эффекторов или синтезируемых ими медиаторов.

Клеточные формы иммунного реагирования связаны со специфическим иммунным функционированием самих Т-лимфоцитов, их рецепторного аппарата распознавания и соединения с антигеном. Основную функцию по уничтожению чужеродных антигенных субстанций осуществляют клетки непосредственно. Считают, что в реакциях клеточного иммунитета участвуют несколько субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-киллеры и природные киллеры).

9.3. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ (ЕСТЕСТВЕННЫЕ) ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Со времени становления иммунологии как науки возникло представление о врожденном и приобретенном противомикробном иммунитете. Врожденный иммунитет к данной инфекции — это состояние, не зависящее от имевшегося ранее спонтанного или экспериментально вызванного контакта с возбудителем или с его антигенами. Это наследуемая устойчивость животных против определенного возбудителя, в основном видовая и породная. Приобретенный иммунитет — невосприимчивость, возникающая у животных в процессе естественного переболевания соответствующей инфекционной болезнью или искусственно созданная у неболевшего (здорового) организма путем его иммунизации биопрепаратами (вакциной, сывороткой).

Таким образом, защита организма от инфекции складывается из последовательного включения в борьбу с проникшим возбудителем трех различных эшелонов этой защиты, со-

ставляющих единый функциональный комплекс, состоящий из факторов естественной резистентности, раннего индукционного ответа, адаптивного или приобретенного иммунного ответа.

Неспецифический (естественный) противомикробный иммунитет обеспечивают анатомо-физиологические, гуморальные, клеточные факторы.

9.3.1. АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Макроорганизмом в ходе эволюции были выработаны защитные механизмы от возбудителя. Для проникновения в восприимчивые клетки и ткани микробу необходимо преодолеть немало защитных барьеров.

Кожно-слизистые барьеры. Первую атаку микроба-агрессора испытывают неповрежденные кожа и слизистые оболочки: это не только механическая преграда, но и стерилизующий фактор в отношении многих видов микроорганизмов. Кожа и слизистые оболочки покрыты слоем эпителиальных, постоянно обновляющихся клеток, преграждающих путь микробу. Вместе с ними при постоянно происходящем слущивании эпителия удаляется и осевшая на нем патогенная микрофлора. На чистой коже относительно быстро погибают некоторые виды бактерий. Например, культура чудесной палочки, нанесенная на здоровую кожу человека, погибает спустя 20 мин. Бактерицидное действие кожи обусловлено веществами, выделяемыми потовыми и сальными железами, а также содержащимися в коже жирными кислотами.

Выраженными барьерными свойствами обладают также конъюнктивы, слизистая оболочка носа и др.

Секреты желез пищеварительного тракта наряду со своими физиологическими функциями обладают способностью обезвреживать многих болезнетворных микробов. Слюна — первый секрет, воздействующий на пищевые вещества, а также на микрофлору, поступающие в ротовую полость. Желудочный сок также обладает бактерицидным и бактериостатическим действием на ряд видов патогенных микробов, однако

в содержимом желудка выживают туберкулезные и спорообразующие бактерии. Желчь действует бактериостатически на ряд микроорганизмов. Слезная жидкость оказывает бактерицидное действие на патогенные микробы, особенно из группы кокков.

Болезнетворные микробы, преодолевшие кожный и слизистый барьеры, начинают массированное проникновение в ткани. В инфицированном участке огромная масса фагоцитов создает защитный вал вокруг микроорганизмов. Возникает местный воспалительный процесс, который ограничивает распространение микробов в соседние ткани и кровь. И. И. Мечников первым указал на защитную роль воспаления.

Воспаление — сложная сосудисто-тканевая защитно-приспособительная реакция организма на действие патогенного раздражителя. Воспаление выполняет защиту организма от воздействия патогенного фактора в виде специфических реакций — фагоцитоза и выработки антител. Благодаря воспалительной реакции фокус повреждения отграничивается от всего организма, происходит ликвидация патогенного фактора, повышение местного и общего иммунитета. При определенных условиях воспаление может приобретать иногда вредоносное значение для организма (некроз тканей, нарушение функций).

Лимфатическая система. При дальнейшем продвижении в ткани и кровь микробы встречают новый барьер — лимфатические узлы. Они расположены по ходу лимфатических сосудов и играют роль своеобразных фильтров, которые задерживают микробные клетки и другие нерастворимые частицы.

Если возбудителю удастся преодолеть и эти защитные преграды, то в макроорганизме происходит изменение уровня обмена веществ и определенных физиологических процессов. Так, при многих инфекциях повышается температура тела в связи с усилением обменных и энергетических процессов. Лихорадочную реакцию, особенно в начальной фазе болезни, следует рассматривать как защитную. Установлено губительное действие повышенной температуры (38–40°C) на некоторые вирусы. Повышение мочеотделения и потоотделения способствуют освобождению организма от ряда возбудителей. При кишечных болезнях диарея сопровождается обильным выделением из организма возбудителей.

9.3.2. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Гуморальные факторы неспецифической защиты организма включают нормальные (естественные) антитела, лизоцим, пропердин, бета-лизины (лизины), комплемент, интерферон, ингибиторы вирусов в сыворотке крови и ряд других веществ, постоянно присутствующих в организме.

Антитела (естественные). В крови животных и человека, которые ранее никогда не болели и не подвергались иммунизации, обнаруживают вещества, вступающие в реакцию со многими антигенами, но в низких титрах, не превышающих разведения 1:10–1:40. Эти вещества были названы **нормальными или природными антителами**. Считают, что они возникают в результате естественной иммунизации различными микроорганизмами.

Лизоцим. Лизосомальный фермент присутствует в слезах, слюне, носовой слизи, секрете слизистых оболочек, сыворотке крови и экстрактах органов и тканей, в молоке; много лизоцима в белке куриных яиц. Он устойчив к нагреванию (инактивируется при кипячении), обладает свойством лизировать живые и убитые в основном грамположительные микроорганизмы.

Метод определения лизоцима основан на способности сыворотки действовать на культуру микрококкус лизодектикус, выращенную на косом агаре. Взвесь суточной культуры готовят по оптическому стандарту (10 ЕД) на физиологическом растворе. Исследуемую сыворотку последовательно разводят физиологическим раствором в 10, 20, 40, 80 раз и т. д. Во все пробирки добавляют равный объем взвеси микробов. Пробирки встряхивают и ставят в термостат на 3 ч при 37°C. Учет реакции производят по степени просветления сыворотки. Титр лизоцима — это последнее разведение, в котором происходит полный лизис микробной взвеси.

Секреторный иммуноглобулин А. Постоянно присутствует в содержимом секретов слизистых оболочек, молочных и слюнных желез, в кишечном тракте; обладает выраженными противомикробными и противовирусными свойствами.

Пропердин (от *лат.* pro и perdere — подготовить к разрушению). Описан в 1954 г. в виде полимера как фактор неспецифической защиты и цитолизина. Присутствует в нормальной

сыворотке крови в количестве до 25 мкг/мл. Это сывороточный белок (бетаглобулин) с молекулярной массой 220 000. Пропердин принимает участие в разрушении микробной клетки, нейтрализации вирусов. Пропердин действует в составе пропердиновой системы: пропердин-комплемент и двухвалентные ионы магния. Нативный пропердин играет значительную роль в неспецифической активации комплемента (альтернативный путь активации).

Лизины — белки сыворотки крови, обладающие способностью лизировать (растворять) некоторые бактерии и эритроциты. В сыворотке крови многих животных присутствуют бета-лизины, вызывающие лизис культуры сенной палочки, а также многих патогенных микробов.

Лактоферрин — негеминовый гликопротеид, обладающий железосвязывающей активностью. Связывает два атома трехвалентного железа, конкурируя с микробами, в результате чего рост микробов подавляется. Синтезируется полиморфноядерными лейкоцитами и гроздевидными клетками железистого эпителия. Является специфическим компонентом секрета желез слюнных, слезных, молочных, дыхательного, пищеварительного и мочеполового трактов. Лактоферрин — фактор местного иммунитета, защищающий от микробов эпителиальные покровы.

Комплемент — многокомпонентная система белков сыворотки крови и других жидкостей организма, которые играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Впервые его описал Э. Бухнер в 1889 г. под названием «алексин» — термолabileльный фактор, в присутствии которого происходит лизис микробов. Термин «комплемент» ввел П. Эрлих в 1895 г.

Комплемент не является устойчивым. Было замечено, что специфические антитела в присутствии свежей сыворотки крови способны вызывать гемолиз эритроцитов или лизис бактериальной клетки, но если сыворотку перед постановкой реакции прогреть при 56°C в течение 30 мин, то лизис не произойдет. Оказалось, что гемолиз (лизис) происходит за счет наличия комплемента в свежей сыворотке. Наибольшее количество комплемента содержится в сыворотке морской свинки.

Система комплемента состоит не менее чем из девяти различных белков сыворотки крови, обозначаемых С1–С9. С1 в

свою очередь имеет три субъединицы — C1q, C1r, C1s. Активированная форма комплемента обозначается черточкой сверху (C̄).

Существует два пути активации (самосборки) системы комплемента — классический и альтернативный, отличающиеся пусковыми механизмами.

При классическом пути активации происходит связывание компонента комплемента C1 с иммунными комплексами (антиген + антитело), куда включаются последовательно субкомпоненты (C1q, C1r, C1s), C4, C2 и C3. Комплекс C4, C2 и C3 обеспечивает фиксацию на клеточной мембране активированного C5 компонента комплемента, а затем включаются через ряд реакций C6 и C7, которые способствуют фиксации C8 и C9. В результате происходит повреждение клеточной стенки или лизис бактериальной клетки.

При альтернативном пути активации комплемента активаторами служат непосредственно сами вирусы, бактерии или экзотоксины. В альтернативном пути активации не участвуют компоненты C1, C4 и C2. Активация начинается со стадии C3, куда включается группа белков: P (пропердин), В (проактиватор), конвертаза проактиватора C3 и ингибиторы и Н. Пропердин в реакции стабилизирует конвертазы C3 и C5, поэтому этот путь активации называют также системой пропердина. Реакция начинается с присоединения фактора В к C3, в результате ряда последовательных реакций в комплекс (конвертаза C3) встраивается P (пропердин), который воздействует как фермент на C3 и C5, и начинается каскад активации комплемента с C6, C7, C8 и C9, что приводит к повреждению клеточной стенки или лизису клетки.

Таким образом, система комплемента служит эффективным механизмом защиты организма, которая активируется в результате иммунных реакций или при непосредственном контакте с микробами или токсинами. Отметим некоторые биологические функции активированных компонентов комплемента:

- участвуют в регуляции процесса переключения иммунологических реакций с клеточных на гуморальные и наоборот;
- C4, связанный с клеткой, способствует иммунному прикреплению;
- C3 и C4 усиливают фагоцитоз;
- C1 и C4, связываясь с поверхностью вируса, блокируют рецепторы, ответственные за внедрение вируса в клетку;

- С3а и С5а идентичны анафилактиксинам, они воздействуют на нейтрофильные гранулоциты, последние выделяют лизосомные ферменты, разрушающие чужеродные антигены, обеспечивают направленную миграцию макрофагов, вызывают сокращение гладких мышц, усиливают воспаление.

Установлено, что макрофаги синтезируют С1, С2, С3, С4 и С5; гепатоциты С3, С6, С8; клетки паренхимы печени — С3, С5 и С9.

Интерферон. Выделен в 1957 г. английскими вирусологами А. Айзексом и И. Линдерманом. Интерферон первоначально рассматривался как фактор противовирусной защиты. В дальнейшем выяснилось, что это группа белковых веществ, функция которых заключается в обеспечении генетического гомеостаза клетки. В качестве индукторов образования интерферона, помимо вирусов, выступают бактерии, бактериальные токсины, митогены и др. В зависимости от клеточного происхождения интерферона и индуцирующих его синтез факторов различают α -интерферон, или лейкоцитарный, который продуцируют лейкоциты, обработанные вирусами и другими агентами; β -интерферон, или фибробластный, который продуцируют фибробласты, обработанные вирусами или другими агентами. Оба эти интерферона отнесены к типу 1. Иммунный интерферон, или γ -интерферон, продуцируют лимфоциты и макрофаги, активированные невирусными индукторами.

Интерферон принимает участие в регуляции различных механизмов иммунного ответа: усиливает цитотоксическое действие сенсibilизированных лимфоцитов и К-клеток, оказывает антипролиферативное и противоопухолевое действие и др. Интерферон обладает видотканевой специфичностью, то есть более активен в той биологической системе, в которой выработан, защищает клетки от вирусной инфекции лишь в том случае, если воздействует на них до контакта с вирусом.

Процесс взаимодействия интерферона с чувствительными клетками включает несколько этапов: адсорбция интерферона на клеточных рецепторах; индукция антивирусного состояния; развитие вирусной резистентности; выраженная резистентность к вирусному инфицированию. Следовательно, интерферон не вступает в прямое взаимодействие с вирусом, а препятствует

проникновению вируса и ингибирует синтез вирусных белков на клеточных рибосомах в период репликации вирусных нуклеиновых кислот. У интерферона также установлены радиационно-защитные свойства.

Ингибиторы — неспецифические противовирусные вещества белковой природы, присутствуют в нормальной нативной сыворотке крови, секретах эпителия слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов, в экстрактах органов и тканей. Обладают способностью подавлять активность вирусов в крови и жидкостях вне чувствительной клетки. Ингибиторы подразделяют на термолabile и термостабильные (выдерживают нагревание до 100°C). Ингибиторы обладают универсальной вируснейтрализующей и антиагглютинирующей активностью в отношении многих вирусов.

Ингибиторы тканей, секретов и экскретов животных оказались активными в отношении многих вирусов: например, секреторные ингибиторы респираторного тракта обладают антиагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью.

Бактерицидная активность сыворотки крови (БАС). Свежая сыворотка крови человека и животных обладает выраженными бактериостатическими свойствами в отношении ряда возбудителей инфекционных болезней. Основные компоненты, подавляющие рост и развитие микроорганизмов, — это нормальные антитела, лизоцим, пропердин, комплемент, монокины, лейкины и другие вещества. Поэтому БАС является интегрированным выражением противомикробных свойств гуморальных факторов неспецифической защиты. Она зависит от состояния здоровья животных, условий их содержания и кормления: при плохом содержании и кормлении активность сыворотки значительно снижается.

Определение БАС основано на способности сыворотки крови подавлять рост микроорганизмов, что зависит от уровня нормальных антител, пропердина, комплемента и др. Реакцию ставят при температуре 37°C с различными разведениями сыворотки, в которые вносят определенную дозу микробов. Разведение сыворотки позволяет установить не только ее способность подавлять рост микробов, но и силу бактерицидного действия, что выражается в единицах.

Защитно-адаптационные механизмы. К специфическим факторам защиты также принадлежит стресс. Факторы, вызывающие стресс, были названы Г. Селье стрессорами. По Селье стресс — особое неспецифическое состояние организма, возникающее в ответ на действие различных повреждающих факторов окружающей среды (стрессоров). Кроме патогенных микроорганизмов и их токсинов в качестве стрессоров могут выступать холод, голод, тепло, тонизирующее излучение и другие агенты, обладающие способностью вызывать ответные реакции организма.

Адаптационный синдром может быть общим и местным. Он обуславливается действием системы, связанной с гипоталамическим центром. Под влиянием стрессора гипофиз начинает усиленно выделять адренокортикотропный гормон (АКТГ), стимулирующий функции надпочечников, вызывая у них усиленное выделение противовоспалительного гормона типа кортизона, снижающего защитно-воспалительную реакцию. Если действие стрессора слишком сильно или продолжительно, то в процессе адаптации возникает болезнь.

При интенсификации животноводства количество стрессовых факторов, воздействию которых подвергаются животные, значительно возрастает. Поэтому профилактика стрессовых воздействий, снижающих естественную резистентность организма и обуславливающих заболевания, является одной из важнейших задач ветеринарной службы.

9.3.3. КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Неспецифическую резистентность макроорганизма обеспечивает фагоцитарная активность микро- и макрофагов.

Фагоцитоз — наиболее древний механизм резистентности, действующий на всех этапах эволюции животного мира. У простейших организмов он обеспечивает одновременно функции питания (поглощение, переваривание) и защиты клеток. На наиболее высоких стадиях эволюции фагоцитоз тем самым выполняет только защитные функции с помощью дифференцированной системы клеток. Фагоцитоз — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных

живых или убитых микробов и других чужеродных частиц с последующим перевариванием при помощи внутриклеточных ферментов.

Фагоцитирующие клетки подразделяют на две основные категории: **микрофаги, или фагоциты (ПМН), и макрофаги, или мононуклеарные фагоциты (МН)**. Абсолютное большинство фагоцитирующих ПМН составляют нейтрофилы. Среди макрофагов различают подвижные (циркулирующие) и неподвижные (оседлые) клетки. Подвижные макрофаги — это моноциты периферической крови, а неподвижные — макрофаги печени, селезенки, лимфатических узлов, выстилающие стенки мелких сосудов и других органов и тканей.

Одним из основных функциональных элементов микро- и макрофагов являются лизосомы — гранулы диаметром 0,25–0,5 мкм, содержащие большой набор ферментов (кислая фосфатаза, β -глюкоронидаза, миелопероксидаза, коллагеназа, лизоцин и др.) и ряд других веществ (катионные белки, фагоцитин, лактоферрин) способных участвовать в разрушении различных антигенов.

Процесс фагоцитоза включает следующие этапы:

- хемотаксис и прилипание (адгезия) частиц к поверхности фагоцитов;
- постепенное погружение (захват) частиц в клетку с последующим отделением части клеточной мембраны и образованием фагосомы;
- слияние фагосомы с лизосомами;
- ферментативное переваривание захваченных частиц и удаление оставшихся микробных элементов.

Активность фагоцитоза связана с наличием в сыворотке крови **опсонинов** — белков нормальной сыворотки крови, вступающих в соединение с микробами благодаря чему последние становятся более доступными фагоцитозу. Различают термостабильные и термолabileльные опсонины. Первые в основном относятся к иммуноглобулину G, хотя могут способствовать фагоцитозу, а также относящиеся к иммуноглобулинам A и M. Ко вторым (разрушаются в течение 20 мин при температуре 56°C) принадлежат компоненты системы комплемента — C1, C2, C3 и C4.

Фагоцитоз, при котором происходит гибель фагоцитированного микроба, называют **завершенным (совершенным)**. Если

микробы, находящиеся внутри фагоцитов, не погибают, то это **незавершенный фагоцитоз**.

Последующее развитие фагоцитарной теории внесло поправки в представления И. И. Мечникова о фагоцитозе как универсальном и господствующем механизме защиты от всех существующих инфекций.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое иммунология?
2. Дайте определение иммунитета.
3. Назовите гуморальные факторы неспецифической защиты.
4. Что такое комплемент? Назовите пути активации комплемента. В чем их особенность?
5. Что такое интерферон? Назовите его основные свойства.
6. Охарактеризуйте ингибиторы, находящиеся в сыворотке крови.
7. Что понимают под термином «бактерицидная активность сыворотки крови» (БАС), за счет каких компонентов она проявляется?
8. Что такое фагоцитоз? Назовите фагоцитирующие клетки.
9. В чем отличие завершеного фагоцитоза от незавершеного?

ГЛАВА 10. ИММУННАЯ СИСТЕМА И ЕЕ ФУНКЦИИ

Иммунная система представляет собой совокупность всех лимфоидных органов и скоплений лимфоидных клеток организма. Лимфоидные органы подразделяют на центральные — тимус, костный мозг, сумка Фабрициуса (у птиц) и ее аналог у животных — пейеровы бляшки; периферические — селезенка, лимфатические узлы, солитарные фолликулы, кровь и др.

Главный компонент иммунной системы — лимфоциты. Взаимодействие различных классов лимфоцитов регулируют основные лимфоидные органы.

Костный мозг — основной орган гемопоэза, в нем находится самоподдерживающаяся популяция стволовых клеток, из которых в дальнейшем образуются Т- и β-лимфоциты. У млекопитающих в костном мозге созревают β-линии лимфоцитов, несущие поверхностные иммуноглобулины. Регуляторная функция клеток костного мозга опосредуется растворимыми факторами, которые относятся к медиаторам иммунитета. Установлено, что клетки костного мозга продуцируют миелопептиды; их биологическое действие сводится к пролиферации и активации антителообразующих клеток.

У млекопитающих животных **тимус** появляется на шестой неделе эмбрионального развития. Он состоит из двух долей, которые делятся на более мелкие дольки. Каждая долька имеет корковый и мозговой слой. Корковый слой заполнен малыми лимфоцитами (тимоцитами). В мозговом слое происходит размножение

тимоцитов и располагаются эпителиальные клетки, играющие важную роль в Т-клеточной дифференцировке. Тимус увеличивается в размерах до наступления половой зрелости, а затем происходит его физиологическая инволюция. Как центральный орган формирования иммунитета, он регулирует функции других лимфоидных органов и сообщает иммунологическую компетентность клеткам-предшественникам.

Тимус выполняет роль эндокринного органа: он продуцирует гуморальные факторы, которые регулируют иммунологические процессы, в первую очередь, влияя на предшественников иммунокомпетентных клеток и этапы антигенно-зависимой дифференцировки Т-лимфоцитов. В тимусе происходит «обучение» и дифференцировка Т-лимфоцитов. «Обучение» обеспечивает лимфоцитам способность отличать клетки своего организма от чужеродных или от видоизмененных своих клеток.

Тимопроизводные лимфоциты, покинувшие тимус, обладают полной иммунокомпетентностью. Известно значительное количество биологически активных веществ тимуса, которые выделяются в отсутствие антигенного раздражителя. Из них наиболее изучены: тимозин, Т-активин, тималин, тимопоэтин, тимостимулин, сывороточный и гуморальный тимусные факторы.

Сумка Фабрициуса. Этот орган имеется только у птиц, он располагается на дорзальной поверхности прямой кишки и с помощью протока связан с задней камерой клоаки. Развивается к 13-му дню эмбрионального развития (у кур), инволюция начинается после седьмой недели жизни цыплят. Представляет собой лимфоэпителиальную ткань, состоящую из фолликулов, имеющих мозговую и корковую зоны. Источником предшественников лимфоидных клеток Фабрициевой сумки служит костный мозг. Под влиянием антигенной стимуляции заселение Фабрициевой сумки лимфоцитами увеличивается, и формирование их в β -лимфоциты не зависит от тимуса. Таким образом, за развитие гуморального иммунитета у птиц ответственна Фабрициева сумка, а у млекопитающих животных β -система лимфоидных клеток образуется из стволовых клеток непосредственно в костном мозге.

Лимфатические узлы пропускают лимфу, отфильтровывают и улавливают антигены. В них различают корковое и мозго-

вое вещество. Коровое вещество состоит из двух зон — кортикальной, или тимус-независимой, и паракортикальной, или тимус-зависимой. Антигенная стимуляция приводит к развитию клеточного иммунитета и паракортикальная зона при этом значительно увеличивается; при гуморальном иммунитете резко увеличивается число центров размножения в кортикальной зоне. Мозговое вещество представляет собой скопления β -лимфоцитов, плазмочитов и макрофагов.

Селезенка — самый крупный орган, выполняющий разнообразные функции. В основном селезенка участвует в иммунных реакциях гуморального типа. При внутривенном введении антигена антитела вырабатываются главным образом в селезенке.

Пейеровы бляшки расположены в подслизистом слое тонкого кишечника и представляют собой совокупность зародышевых центров, подобно корковому слою сумки Фабрициуса. В пейеровых бляшках преобладают β -лимфоциты, ответственные за развитие гуморального иммунитета. Установлено, что в подслизистом слое кишечника млекопитающих содержится в три раза больше лимфоцитов, чем в крови.

Кровь, являясь периферическим органом иммунной системы, представлена отдельными лимфоидными клетками различного назначения и разной степени зрелости, а также гранулоцитами и моноцитами. Кровоток насыщается лейкоцитами за счет лимфы и лимфоидных органов уже в период внутриутробного развития.

Способность организма отвечать на воздействие любого антигена обусловлена наличием различных групп лимфоцитов, составляющих исключительно неоднородную популяцию клеток. Лимфоциты различаются между собой по специфичности и функциональным свойствам. Выделены два основных класса лимфоцитов: β -лимфоциты, которые являются предшественниками антителообразующих клеток, и Т-лимфоциты (или тимус-зависимые), подразделяемые на подклассы. Кроме лимфоцитов двух главных классов известны лимфоциты, осуществляющие некоторые «неспецифические» цитотоксические реакции. К ним принадлежат так называемые природные (естественные) киллеры, способные убивать некоторые виды опухолевых клеток и ряд вирусных антигенов. Имеются еще нулевые клетки, или

К-киллеры, не несущие отличительных маркеров Т- или β -лимфоцитов.

В функциональном отношении клетки иммунной системы разделяют на две категории: регуляторные и их предшественники (эффektorные). Функции первых осуществляют в основном Т-лимфоциты и макрофаги. Вторыми могут служить многие типы клеток: цитотоксические Т-лимфоциты, β -лимфоциты, макрофаги, естественные киллеры и К-киллеры.

10.1. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛАССОВ ЛИМФОЦИТОВ

Т-лимфоциты. Тимусзависимые лимфоциты образуются из стволовых клеток кроветворной ткани. Предшественники Т-лимфоцитов поступают в тимус, претерпевают в нем дифференцировку и выходят уже в виде клеток с различными функциями, несущих на себе характерные маркеры. Различают несколько субпопуляций Т-лимфоцитов в зависимости от биологических свойств.

Т-хелперы (помощники) относятся к категории регуляторных вспомогательных клеток. Стимулируют пролиферацию В-лимфоцитов и дифференцировку в антителообразующие клетки (плазматические клетки). Установлено, что ответ β -лимфоцитов на воздействие большинства белковых антигенов полностью зависит от помощи Т-хелперов, которая осуществляется двумя способами. В первом случае требуется прямое воздействие хелперной Т-клетки и реагирующей β -клетки. Полагают, что Т-клетка распознает детерминанты антигенной молекулы, которая уже зафиксирована на β -клетке рецепторами клетки. Во втором случае хелперная функция Т-клеток в активации β -лимфоцитов может осуществляться также путем образования растворимых неспецифических хелперных факторов — лимфокинов (цитокинов).

Т-киллеры (убийцы) выполняют эффektorные функции, осуществляя клеточные формы иммунного ответа. Они распознают и лизируют клетки, на поверхности которых имеются чужеродные для данного организма антигены (опухолевые, вирусные и гистосовместимости). Проллиферация и дифференцировка Т-киллеров происходит с участием Т-хелперов, действие

которых осуществляется в основном с помощью растворимых факторов, в частности интерлейкина. Установлено, что Т-киллеры осуществляют реакцию гиперчувствительности замедленного типа.

Т-усилители активизируют иммунный ответ в рамках Т-подсистемы иммунитета, а Т-хелперы обеспечивают возможность его развития в β -звене иммунитета в ответ на тимусзависимые антигены.

Т-супрессоры (подавляющие) обеспечивают внутреннюю саморегуляцию системы иммунитета двумя способами: клетки-супрессоры ограничивают иммунный ответ на антигены; предотвращают развитие аутоиммунных реакций. Т-супрессоры тормозят выработку антител, развитие гиперчувствительности замедленного типа; формирование Т-киллеров обеспечивает становление и поддержание иммунологической толерантности.

Т-клетки иммунной памяти обеспечивают иммунный ответ вторичного типа в случае повторного контакта организма с данным антигеном. На мембранах Т-клеток обнаружены антигенсвязывающие рецепторы и Fc-рецепторы, IgA или IgM. Нулевые лимфоциты не имеют отличительных маркеров Т- и β -лимфоцитов. Они способны осуществлять антителозависимый, не требующий присутствия комплемента, лизис клеток-мишеней при наличии специфических против данных клеток антител. К-лимфоциты являются разновидностью нулевых лимфоцитов. Для них клетками-мишенями являются опухолевые клетки, измененные вирусами Т- и β -лимфоциты, моноциты, фибробласты, эритроциты.

β -лимфоциты. Как и Т-лимфоциты, образуются из стволовых клеток кроветворной ткани. Предшественники β -лимфоцитов в сумке Фабрициуса претерпевают дифференцировку и затем мигрируют в лимфатические узлы и селезенку, где и выполняют свои специфические функции.

Установлено наличие двух классов β -клеток: β -эффекторы и β -регуляторы. Эффекторными клетками β -лимфоцитов являются антителообразующие клетки (плазматические), синтезирующие антитела одной специфичности, то есть против одной антигенной детерминанты. β -регуляторы, в свою очередь, делятся на супрессоры и усилители (амплифайеры). Функция регуляторов заключается в выделении медиаторов, угнетающих

продукцию ДНК в Т- и β -лимфоцитах только в пределах костного мозга, а также усиление β -эффекторов. β -лимфоциты крупнее Т-лимфоцитов (соответственно 8 и 5 мкм). Благодаря электронной микроскопии выяснено, что поверхность β -лимфоцитов покрыта многочисленными ворсинками и складчатая, а поверхность Т-лимфоцитов гладкая.

Макрофаги. Третий тип клеток, непосредственно участвующих в формировании гуморального и клеточного иммунных ответов. Макрофаги развиваются из миелопоэтической стволовой клетки костного мозга, проходя следующие этапы: промоноцит, циркулирующий моноцит, тканевой макрофаг. Макрофаги участвуют в кооперативном взаимодействии с β - и Т-клетками. Они осуществляют первичное распознавание, переработку антигенов и подачу их к Т- и β -лимфоцитам, а также участвуют в образовании биологически активного вещества — интерлейкина, активизирующего Т-хелперы. Макрофаги необходимы и для образования антител, хотя они их не синтезируют. Макрофаги способны связывать IgA на своей поверхности при помощи Fc-рецепторов. Благодаря этому в присутствии антигена происходит специфическая реакция антиген — антитело на поверхности макрофага, а возникшие таким образом иммунные комплексы более интенсивно фагоцитируются.

Макрофаги функционально неоднородны. Однако все популяции макрофагов иммунокомпетентны или должны быть активированы, только в этом случае они участвуют в иммуногенезе. Лимфоциты непосредственно или с помощью медиаторов различно воздействуют на макрофаги: задерживают их агрегацию, усиливают или, наоборот, ослабляют их подвижность, оказывают на них цитотоксическое действие, привлекают макрофаги «на себя» (хемотаксис), усиливают фагоцитоз микроорганизмов или других частиц. На поверхности макрофагов отсутствуют Fc-рецепторы.

ГЛАВА 11. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Специфический иммунный ответ у животных осуществляет иммунная система, обладающая уникальной способностью распознавать множество разнообразных микроорганизмов, чужеродные агенты и молекулы, называемые антигенами, и вырабатывать в ответ специфические антитела и sensibilized лимфоциты.

11.1. АНТИГЕНЫ

Антигены — все вещества, которые несут признаки генетической чужеродности и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций.

Антигенные вещества представляют собой высокомолекулярные соединения, обладающие определенными свойствами: чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью, коллоидной структурой и определенной молекулярной массой. Антигенами могут быть разнообразные вещества белковой природы, а также белки в соединении с липидами и полисахаридами.

Антигенными свойствами обладают клетки животного и растительного происхождения, яды животных (змей, скорпионов, пчел и др.) и растений (рицин, кортин и др.), сложные комплексы, состоящие из полисахаридов, липидов, белков. Антигенными свойствами обладают вирусы, бактерии, микроскопические грибы, простейшие, экзо- и эндотоксины микроорганизмов.

Антигенность — способность антигена вызывать иммунный ответ. Степень иммунного ответа организма на различные антигены неодинакова, то есть на каждый антиген вырабатывается неодинаковое количество антител.

Иммуногенность — способность создавать иммунитет. Это понятие относится главным образом к микробным антигенам, обеспечивающим создание иммунитета к инфекционным болезням. Антиген, чтобы быть иммуногенным, должен быть чужеродным в отношении данного реципиента, иметь молекулярную массу не менее 10 000. С увеличением молекулярной массы иммуногенность нарастает. Корпускулярные антигены (бактерии, грибы, простейшие, эритроциты) более иммуногенны, чем растворимые. Среди растворимых большей иммуногенностью обладают высокомолекулярные, например агрегированные антигены.

Специфичность — особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Ее определяет антигенная детерминанта, то есть небольшой участок молекулы антигена, который и соединяется с выработанным на него антителом. Число таких участков (группировок) у разных антигенов различно, и оно определяет число молекул антител, с которыми может соединяться антиген (валентность). От числа детерминант зависит валентность антигена: чем больше молекула, тем выше валентность.

Антигены подразделяют на полноценные и неполноценные (гаптены). Первые вызывают в организме синтез антител или сенсбилизацию лимфоцитов и вступают с ними в реакцию, для них характерна строгая специфичность, то есть они вызывают в организме выработку только специфических антител, вступающих в реакцию только с данным антигеном. Вторые представляют собой сложные углеводы, липиды и другие вещества, не способные вызывать образование антител в организме, но вступающие с ними в специфическую реакцию. Добавление к гаптенам небольших количеств белка придает им свойства полноценных антигенов. Белок, который укрупняет молекулу гаптена, получил название «шлеппер». К гаптенам относятся и гетерогенные антигены Д. Форсмана, которые были описаны в 1911 г. Форсман показал, что в органах животных разных видов (кошек, собак, лошадей, кур, морских свинок и др.) содержится

общий антиген, но он отсутствует у человека, обезьян, кроликов, уток, крыс, т. е. это липоидная фракция, обладающая свойством гаптена.

Конъюгированные антигены — обобщенное название белков, которые приобрели новую антигенную специфичность благодаря присоединению к ним с помощью химической связи новой химической группировки.

По специфичности антигены животного происхождения подразделяют на видовые, групповые, органные и стадиоспецифичные.

Видовая специфичность — животные разных видов имеют антигены, свойственные только данному виду, что используется при определении фальсификации мяса, групп крови с помощью антивидовых сывороток.

Групповая специфичность характеризует антигенные различия животных по полисахаридам эритроцитов, белкам сыворотки крови, поверхностным антигенам ядерных соматических клеток. Антигены, обуславливающие внутривидовые различия индивидуумов или групп особей между собой, называют изоантигенами, например групповые эритроцитарные антигены человека.

Органная (тканевая) специфичность характеризует неодинаковую антигенность разных органов животного, например печень, почки, селезенка различаются между собой антигенами.

Стадиоспецифические антигены возникают в процессе эмбриогенеза и характеризуют определенный этап внутриутробного развития животного, его отдельных паренхиматозных органов.

Аутоантигены. В некоторых случаях белки собственных тканей (сердца, печени, почек и др.) при взаимодействии с бактериальным белком, токсинами или ферментами бактерий, лекарственными веществами, под влиянием физических факторов (ожог, обморожение, облучение) изменяют свои физико-химические свойства и становятся чужеродными для организма — аутоантигенами. На эти антигены организм вырабатывает антитела, то есть возникают аутоиммунные болезни.

Антигены бактериальной клетки. Отдельные структуры микроорганизмов, экзо- и эндотоксины обладают свойством полноценных антигенов. Различают общие для родственных

видов антигена — видовые и групповые, и антигены типоспецифические, свойственные определенному типу (варианту).

По расположению в микробной клетке различают: антигены капсульные (у бактерий, образующих капсулы), поверхностные — антигены клеточной стенки (К-антигены), соматические (О-антигены), жгутиковые (Н-антигены).

Капсульные антигены лучше всего изучены у *E. coli*. Различают несколько поверхностных антигенов, входящих в состав К-антигена, которые обозначают латинскими буквами А, В и L. А-антиген — капсульный, β- и L-антигены — поверхностные клеточной стенки, по химическому строению представляют собой полисахариды и полипептиды. Соматические О-антигены локализованы во внутреннем слое клеточной стенки и цитоплазматической мембране клетки и представляют собой липополисахаридополипептидный комплекс, обладающий специфичностью и иммуногенными свойствами. У грамотрицательных бактерий антиген является их эндотоксином. Соматический антиген термостабилен. Жгутиковые Н-антигены присутствуют у всех подвижных бактерий. Это термолабильные белковые комплексы, обладающие у многих энтеробактерий двумя наборами детерминант — специфической (первой) и неспецифической (второй или групповой) фазами.

Экзотоксины большинства микроорганизмов обладают свойствами полноценных антигенов с выраженной неоднородностью в пределах вида и рода. Антигенными свойствами обладают также споры: они содержат антиген, общий вегетативной клетке, и споровой антиген.

Среди бактериальных антигенов выделяют так называемые защитные или протективные антигены. Антитела, синтезированные на эти антигены, защищают организм от заражения данным микробом. Протективными свойствами обладают капсульные антигены пневмококков, М-протеин стрептококков, А-протеин стафилококков, экзотоксин сибиреязвенной бациллы, белковые молекулы внутренних слоев стенки некоторых грамотрицательных бактерий и др. Очищенные протективные антигены не обладают пирогенными и аллергизирующими свойствами. Установлено, что в результате естественного отбора среди микробов возникают такие штаммы, у которых антигены сходны с антигенами организма человека и животных. При

заражении такими микробами иммунная система на них не реагирует, так как лимфоциты их не распознают. Например, у стрептококков есть антигены, общие с антигенами тканей млекопитающих животных, в этом случае при заражении возбудитель будет беспрепятственно размножаться в организме и обусловит его гибель.

Антигены некоторых микробов обладают адгезивными свойствами. Природа адгезивности во многом еще не ясна. Помимо связи с определенными антигенными структурами отмечают такую с определенным набором ферментов (например, у холерного вибриона нейраминидазы, гиалуронидазы).

Все антигены (природные и искусственные) состоят из двух компонентов: высокомолекулярного коллоидного вещества (белка), что определяет его антигенные свойства и аминокислотных остатков, полисахаридов или липидов, расположенных на поверхности белка. Он определяет специфичность антигена и называется детерминантной группой. Таким образом, в качестве детерминантной группы функционирует не вся молекула антигена, а только ее сравнительно небольшая часть, которая непосредственно реагирует с антителом.

На поверхности антигена обычно располагается несколько детерминантных групп, обладающих одинаковой или близкой специфичностью, что обуславливает поливалентность антигена.

Изучение специфичности антигенов и природы детерминантных групп имеет важное теоретическое и практическое значение. Изменяя детерминантную группу антигена, можно целенаправленно изменить его специфичность, т. е. конструировать искусственные антигены с новой иммунохимической специфичностью.

Общие антигены у представителей различных видов микробов, животных и растений называют **гетерогенными**. Например, гетерогенный антиген Форсмана содержится в органах морской свинки, в эритроцитах барана и у сальмонелл. Гетерогенные антигены состоят из белков, липидов и углеводов; липиды и углеводы обуславливают их специфичность. Гетерогенные антигены отличаются друг от друга по химическому составу.

Существование общих гетероантигенов у животных и паразитирующих в их организме микробов можно рассматривать как приспособление разных патогенных микробов к существованию

в организме за счет общих антигенов. В результате подобной маскировки организм недостаточно активно отвечает на инфекцию, вызванную патогенными агентами, вследствие чего он остается перед ними незащищенным.

11.2. ФОРМЫ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ (ИММУННЫЙ ОТВЕТ)

Важнейшее свойство иммунной системы — способность различать множество собственных и чужих антигенных детерминант и давать на них дифференцированные и равнозначные ответы — обеспечивается соответствующим разнообразием молекул трех главных типов иммунологических рецепторов — антигенраспознающих иммуноглобулиновых рецепторов β - и Т-лимфоцитов и антигенпредставляющих рецепторов главного комплекса тканевой совместимости.

Различают пять форм специфических реакций:

- 1) собственно иммунологическая реактивность синтеза антител;
- 2) формирование иммунологической памяти;
- 3) иммунологическая толерантность;
- 4) гиперчувствительность замедленного типа;
- 5) гиперчувствительность немедленного типа.

Лимфоциты обладают способностью «выбирать» определенную форму иммунного ответа на внедрение того или иного антигена. Этот выбор обусловлен сложными процессами, происходящими в лимфоидной ткани, — дифференцировкой клеток, несущих иммунологическую функцию, и их межклеточными кооперациями. Клетки, обеспечивающие иммунный ответ, называют **иммунокомпетентными**. К ним принадлежат, как ранее упоминалось, Т- и β -лимфоциты и макрофаги.

β -лимфоциты — предшественники плазматических клеток (плазмобластов и плазмоцитов), продуцентов иммуноглобулинов разных классов: М, G, А, Е, D.

Субпопуляции Т-лимфоцитов различаются по своим функциям. Клетки-помощники кооперируют с β -лимфоцитами при образовании гуморальных антител против тимусзависимого антигена. Клетки-супрессоры регулируют активность специфич-

ческого гуморального иммунного ответа, стимулируя или подавляя его. Эффекторными клетками клеточного иммунитета подразделяются на долгоживущие клетки памяти и клетки-киллеры, или убийцы, обладающие цитотоксической активностью против чужеродных для организма клеток-мишеней и способные, выделяя разнообразные медиаторы иммунного ответа (лимфокины), стимулировать и вовлекать в борьбу против чужеродных антигенов различные клетки крови и системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) развивается также благодаря участию Т-лимфоцитов, активация которых антигеном сопровождается высвобождением из них лимфокинов. При контакте с антигеном β - и Т-лимфоциты, наиболее родственные по своей рецепторной структуре пространственной структуре антигена, превращаются в юные blastные формы, делятся, таким образом быстро обеспечивая потребность организма в реагирующих с данным антигеном β - и Т-лимфоцитах.

Для специфического иммунного ответа против большинства Т-зависимых антигенов необходимо взаимодействие (кооперация) различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (ИКК): Т- и β -лимфоцитов и макрофагов. Центральную роль в этой кооперации играют поверхностные антигены ИКК, кодируемые генами главного комплекса гистосовместимости. Взаимодействие клеток в иммунном ответе происходит следующим образом (см. рис. 15).

Проникший в организм антиген сам по себе или чаще в виде иммунных комплексов с предсуществующими антителами связывается с макрофагами. Иммунные комплексы связываются за счет имеющихся на макрофагах рецепторов для Fc-фрагментов антител. Взаимодействие макрофагов с иммунными комплексами активирует эти клетки, что выражается в секреции макрофагами факторов, активирующих Т-клетки, называемые интерлейкинами-1. Интерлейкины-1, в свою очередь, стимулируют Т-клетки-помощники, которые выделяют факторы (в частности, BRME — фактор репликации и созревания β -клеток), способствующие пролиферации и дифференциации β -лимфоцитов; В-лимфоциты размножаются и превращаются в антителосекретирующие клетки. Однако для функционирования



Рис. 15
 Схема иммунных процессов в организме

последовательности «макрофаг — Т-лимфоцит-помощник — β-лимфоцит» необходимы следующие условия:

- Т-лимфоцит-помощник, участвующий в кооперации, должен обладать антигенраспознающим рецептором против иммунной части антигена;
- Т-лимфоцит-помощник должен уметь распознавать антигены на β-клетке и на макрофаге (кооперация эффективна только в случае их идентичности);

- β -клетка при распознавании антигена связывается своим иммуноглобулиновым антигенраспознающим рецептором с соответствующей антигенной детерминантой, которая, как правило, не совпадает с участком антигена, распознаваемым Т-клеткой.

Тем не менее механизм взаимодействия трех типов ИКК, который приводит к синтезу антител в результате действия антигенов, значительно сложнее. Так, Т-клетка-помощник, активирующая β -клетки, находится под контролем нескольких субпопуляций Т-клеток-супрессоров, которые, в свою очередь, контролируются по типу обратной связи факторами, образуемыми β -клетками и Т-клетками-помощниками.

Супрессорные Т-клетки осуществляют отрицательную регуляцию Т-клеток-помощников, эффекторных Т-лимфоцитов, β -клеток и антителосекретирующих плазматических клеток. Они специфичны для данного антигена, угнетают пролиферацию и дифференциацию указанных выше клеток, тормозят их эффекторные функции (биосинтез антител и различных факторов).

Таким образом, разные субпопуляции Т-лимфоцитов, выделяя антиген-специфические и неспецифические факторы, осуществляют сложнейшую регуляцию ИКК или самостоятельно выполняют эффекторные, например цитолитические, функции в иммунитете.

11.3. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ. АНТИТЕЛА (ИММУНОГЛОБУЛИНЫ)

Защиту организма в течение первых 96 ч после инфицирования осуществляют неспецифические факторы естественной резистентности и раннего индуцибельного ответа. Примерно одновременно начинает развиваться собственно специфический иммунитет, представляющий собой заключительный и наиболее мощный этап защиты. Он включает развитие протективного иммунитета и иммунологической памяти. Протективный иммунитет формируется с развитием гуморального и клеточного иммунного ответа. Сущность гуморального ответа заключается в образовании популяций β -лимфоцитов, синтезирующих специфические антитела.

Антитела — это специфические белки иммуноглобулины, синтезируемые в организме определенным типом клеток под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться.

Антитела — важнейшие специфические факторы защиты организма против возбудителей инфекционных болезней и генетически чужеродных веществ. Они образуются в организме в результате естественного инфицирования, вакцинации живыми или убитыми вакцинами, контакта лимфоидной системы с чужеродными клетками или тканями (трансплантатами) либо с собственными аутоантигенами.

Первоначально антитела условно классифицировали по их функциональным свойствам на нейтрализующие, лизирующие и коагулирующие. К первым были отнесены антитоксины, антиферменты и вируснейтрализующие лизины; ко вторым — агглютинины и преципитины; к третьим — гемолитические и комплементсвязывающие антитела. С учетом функциональной способности антител были даны названия серологическим реакциям: агглютинация, гемолиз, лизис, преципитация и др. Кроме того, антитела подразделены по физическим свойствам на тепловые, которые хорошо вступают в реакцию взаимодействия при температуре 37°C, и холодовые (криофильные), вступающие в реакцию при 4°C. По подвижности в электрическом поле белки сыворотки крови разделяются на альбумины и три глобулиновые фракции — α , β и γ . При помощи электрофореза удалось установить, что антитела связаны только с β - и γ -глобулиновыми фракциями.

В дальнейшем для разделения антител применили метод высокоскоростного центрифугирования. Скорость седиментации белков измеряют в единицах Сведберга (S). В результате центрифугирования антитела были разделены на две основные группы: 7S — небольшие молекулы антител, 19S — большие молекулы антител. После электрофореза антитела 7S в основном обнаруживаются в γ -глобулиновой фракции, а 19S — в β -глобулиновой.

Также было установлено, что антитела имеют различное количество активных центров в молекуле, которые определяют их валентность. В связи с этим они были разделены на:

- полные (двух- и пятиявалентные) — при взаимодействии с антигеном, в ответ на который они выработаны, дают визу-

ально видимые реакции (агглютинации, лизиса, преципитации и др.);

- неполные (моновалентные, блокирующие — при специфическом взаимодействии с гомологичным антигеном не дают видимого проявления серологической реакции, то есть не могут агрегировать частицы в крупные конгломераты, а лишь блокируют их.

Неполные антитела образуются независимо от полных антител и выполняют те же функции. Представлены они различными классами иммуноглобулинов. Для обнаружения неполных антител существуют специальные реакции — Кумбса, блокирующая проба и др.

Следует отметить, что при поступлении антигена в организм могут образовываться антитела с различной функциональной активностью (преципитины, агглютинины, лизины и др.). Все они идентичны, различно лишь их действие. Точное число возможных антител неизвестно, предполагают, что их не менее 10 000.

В соответствии с Международной классификацией сывороточные белки, несущие «антительную» активность и называвшиеся ранее гамма-глобулинами, получили название иммуноглобулинов и обозначаются символом Ig. Иммуноглобулины подразделяют на классы (пять классов — IgG, IgM, IgD, IgA, IgE), а в пределах каждого класса — на подклассы.

11.3.1. СТРУКТУРА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Иммуноглобулины — белки с четвертичной структурой, то есть их молекулы построены из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из четырех полипептидных цепей — двух тяжелых и двух легких, связанных между собой дисульфидными мостиками, являющимися активным центром (участок молекулы иммуноглобулина, взаимодействующий только с комплементарным участком молекулы специфического антигена). Легкие цепи (L) — структура, общая для всех классов и подклассов. Тяжелые цепи (H) имеют характерные структурные особенности, присущие определенному классу (подклассу). Легкие цепи подразделены на два типа: κ (каппа) и λ (лямбда). Тяжелые цепи обозначают греческими буквами γ (гамма), μ (мю), α (альфа), δ (дельта) и ϵ (эпсилон) —

соответственно латинскому обозначению того или иного класса иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA и др.

В молекуле иммуноглобулина различают два вида межцепевых связей — между одноименными тяжелыми цепями и между легкими и тяжелыми цепями. При обработке молекул папаином они расщепляются на три фрагмента: два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Fab-фрагмент обладает способностью связываться с антигеном, но не вызывает агглютинацию и преципитацию. Fc-фрагмент связывает комплемент, а также обеспечивает прикрепление Ig к Fc-рецептору клеточных мембран. При расщеплении иммуноглобулина пепсином образуется двухвалентный F(ab)2 — фрагмент, который благодаря своей двухвалентности действует как полное антитело и обладает способностью агглютинировать или преципитировать специфические антигены (рис. 16).

При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что IgG имеет Y-образную форму, а IgM — звездчатую конфигурацию со средним диаметром 30–35 нм (рис. 16).

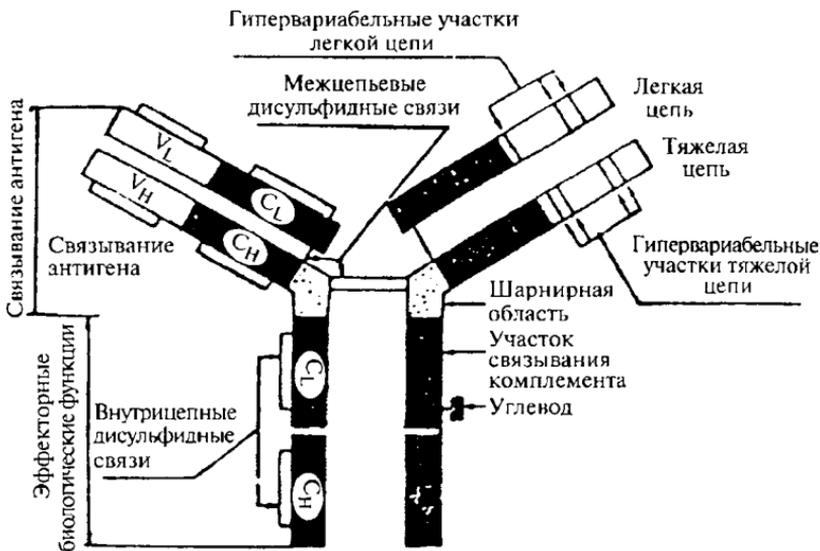


Рис. 16
Структура молекулы Ig. Локализации участков, ответственных за различные функции:

V_L, V_H — вариабельные; C_L, C_H — константные.

Антитела, образовавшиеся при иммунном ответе организма, при всей специфичности неоднородны и отличаются друг от друга, то есть они **гетерогенны**. Предполагается, что существует более 100 000 антигенов и к каждому из них синтезируется «свое» специфическое антитело. Главной основой гетерогенности (разнообразия специфичностей) антител служит уникальность их активных центров. Антитела гетерогенны по принадлежности к различным классам и подклассам, а также по физико-химическим и биологическим свойствам.

11.3.2. СВОЙСТВА АНТИТЕЛ

Антитела, входящие в определенные классы иммуноглобулинов, обладают различными физическими, химическими, биологическими и антигенными свойствами.

Имуноглобулины содержат три вида антигенных детерминант: изотипические, аллотипические и идиотипические. У каждого биологического вида тяжелые (5 классов) и легкие (2 типа) цепи иммуноглобулинов имеют определенные антигенные особенности. Одинаковые антигенные детерминанты для каждого представителя данного вида называют изотипическими (изотипы). Вместе с тем имеются внутривидовые различия названных цепей иммуноглобулинов — **аллотипы**, обусловленные генетическими особенностями организма-продуцента: их признаки генетически детерминированы. Например, у тяжелых цепей описано более 20 аллотипов. Существуют различия между разными антителами, даже если они относятся к одному классу, подклассу или аллотипу, — **идиотипы**. Они характеризуют «индивидуальность» данного иммуноглобулина в зависимости от специфичности антигена-индуктора.

Все указанные антигенные различия определяют с помощью специфических антисывороток.

Имуноглобулин М (IgM). Молекулярная масса — 950 000, константа седиментации — 19S, функционально валентен, первым появляется после заражения или вакцинации животного. Обладает выраженной способностью агглютинировать, преципитировать или лизировать антигены, а также связывать комплемент. Находится преимущественно в плазме крови, при инфекционных процессах количество его значительно повышается. Не участвует в аллергических реакциях и не проходит через плаценту.

Иммуноглобулин G (IgG). Наиболее изученный класс антигенов. Молекулярная масса — 160 000, константа седиментации — 7S. В сыворотке крови содержится в наиболее высокой концентрации (в среднем 12 г/л) и составляет от 70 до 85% всех иммуноглобулинов, присутствует также в тканевых жидкостях. Двухвалентен, образует с поливалентными антигенами сетевую структуру. Вызывает преципитацию растворимых антигенов. Принимает участие в реакции агглютинации и опсонизации корпускулярных антигенов. Для лизиса антигена необходимо связывание с молекулой комплемента. IgG играет ведущую роль в защите от многих вирусных и бактериальных инфекций (оспа, бешенство, столбняк и др.), обладает выраженными свойствами нейтрализации токсинов, выдерживает нагревание при 75°C в течение 30 мин.

Четыре подкласса IgG различают между собой по структуре тяжелых цепей и молекулярной массе. У крупного рогатого скота известно два подкласса — IgG1 и IgG2. Молекулы иммуноглобулина (за исключением IgG2) способны связываться с клетками тканей и вызывать их специфическую сенсибилизацию, вследствие чего иммуноглобулин принимает участие в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Скорость синтеза составляет 32 мг на 1 кг массы в сутки. Концентрация его значительно повышается при различных инфекционных и аутоиммунных процессах.

Иммуноглобулины класса A (IgA) представлены двумя видами — сывороточным и секреторным.

Сывороточный IgA. Молекулярная масса — 170 000, константа седиментации — 7S, концентрация в сыворотке крови составляет 15–20% от общего количества иммуноглобулинов. Не обладает способностью преципитировать растворимые антигены, не связывает комплемент по классическому пути. Принимает участие в реакции нейтрализации токсинов. Термоустойчив. Синтезируется в селезенке, лимфатических узлах и в слизистых оболочках; поступает в секреты — слюну, слезную жидкость, бронхиальный секрет, молозиво.

Секреторный IgA (SIgA). Имеет добавочный структурный компонент, отсутствующий в сывороточном. Представляет собой полимер, чаще димер: молекулярная масса — 380 000, константа седиментации — 11S и 15S. Синтезируется в слизистых оболочках. Биологическая функция IgA заключается в основ-

ном в местной защите слизистых оболочек, например, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта или дыхательных путей. В кишечном тракте SIgA устраняет бактериальную адгезию, нейтрализует вирусы. SIgA образуется в результате ассоциации димерной формы IgA с особым белком, названным секреторным компонентом, находящимся в собственном слое слизистой оболочки. SIgA проходит базальную мембрану и проникает в эпителиальную клетку, где соединяется с секреторным компонентом, после чего происходит выход синтезированного SIgA на поверхность эпителиального покрова кишечника.

Иммуноглобулин D (IgD). Молекулярная масса — 160 000, константа седиментации — 7S. Концентрация IgD в сыворотке крови человека не превышает 1% от общего количества иммуноглобулинов. Биологическая функция его не совсем ясна. Установлено, что он является одним из основных иммуноглобулинов, входящих в состав рецепторов β -лимфоцитов; термостабилен, может активизировать комплемент по альтернативному пути, обладает антивирусной активностью, не связывается с тканями. Отмечено увеличение его содержания при миеломной болезни у человека.

Иммуноглобулин E (IgE). Впервые идентифицирован в 1966 г., идентичен антителам, ранее названным реакинами. Молекулярная масса — 190 000, константа седиментации 8,5S. Концентрация в сыворотке крови составляет в среднем 0,25 мг/л. IgE термоллабилен, инактивируется при 56°C в течение 1 ч, не связывает комплемент, быстро и прочно связывается с клетками тканей, тканевыми базофилами, принимает участие в реакции гиперчувствительности немедленного типа. У человека обуславливает атипические реакции — сенную лихорадку, крапивницу, бронхиальную астму. При аллергических заболеваниях концентрация IgE в сыворотке крови значительно увеличивается и может составлять в среднем 1,6 мг/л. Считают, что IgE играет защитную роль при гельминтозных и протозойных заболеваниях, в частности способствует усилению фагоцитарной активности макрофагов и эозинофилов. IgE обнаружен у людей, больных ревматизмом и системной волчанкой.

Классы иммуноглобулинов у животных и птиц. У лошадей установлены IgM, IgG и IgA, у крупного рогатого скота — IgG (два подкласса G1 и G2), IgM и IgA, у свиней, овец и коз — IgM, IgG и IgA, у домашних птиц — IgM, IgG и IgA.

11.3.3. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Во многих исследованиях, связанных с изучением патологии животных, используют антитела, специфически реагирующие с антигеном. Известно, что иммунная система организма вырабатывает специфические антитела на огромное множество антигенов. В основе такой способности лежит наличие большого разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа с узкой специфичностью. Общее число клонов у мышей, например, достигает 107–1010. В ответ на данный антиген в реакцию вовлекается множество клонов, что обуславливает высокую гетерогенность синтезируемых антител. Так, при иммунизации комплексом «гаптен — белок» образуется до 8000 различных антител.

Спектр вырабатываемых антител изменяется в ходе иммунного ответа, различен он и у разных видов животных. Поэтому при использовании антисывороток для идентификации и количественного определения антигенов возникает проблема неспецифического связывания и перекрестной реакции антител.

Многие исследователи пытались получить антитела с узкой специфичностью. Например, бактериальные полисахариды в определенных условиях дают антитела с высокой специфичностью. В 1975 г. Д. Кехлер и Ц. Милстейн предложили принципиально новый подход к получению гомогенных антител методом гибрида. С его помощью производят слияние плазматомы (опухоловой клетки, возникшей из антителообразующих клеток) с клетками селезенки иммунизированного животного. Так получают гибридные клетки (гибридомы), способные неограниченно размножаться и синтезировать антитела узкой специфичности (моноклональные антитела). Следует подчеркнуть, что моноклональные антитела, обладая высокой специфичностью, могут не обнаруживать некоторые антигенные детерминанты у родственных микроорганизмов, а также исключают участие комплемента в реакции «антиген — антитело», иммунной преципитации. Поэтому в ряде случаев целесообразно использовать поликлональные сыворотки.

Процесс получения моноклональных антител включает следующие этапы:

- иммунизация животных;
- подготовка клеток к слиянию;
- слияние;
- отбор клонов, продуцирующих антитела;
- клонирование и реклонирование;
- накопление гибридомных клеток;
- получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела;
- выделение антител.

Основные этапы получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела, схематически представлены на рисунке 17.

Получение гибридом возможно при соблюдении специальных условий: стерильность, наличие соответствующих реактивов и питательных сред для культивирования клеток. При этом антиген должен быть достаточно очищенным для иммунизации, так как организм вырабатывает антитела на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала, что значительно осложняет отбор клонов, продуцирующих антитела к интересующей антигенной детерминанте.

Методы иммунизации организма постоянно совершенствуются. Для этого используют культуры лимфоцитов, выращенные в суспензии, или же лимфоциты культивируют в маленькой камере на диализной мембране, через которую происходит обмен питательных веществ, поступающих из небольшого резервуара (Д. Марбрук, 1967).

После слияния клеток и отбора гибридомных клеток, продуцирующих антитела, осуществляют клонирование с целью выделения стабильных клеточных линий. Для этого используют метод лимитирующих разведений в полужидком агаре. После отделения клонов клеток, синтезирующих антитела, их размножают в достаточном количестве и замораживают. Для получения больших количеств моноклональных антител отдельные образцы размножают *in vitro* в монослое или в суспензии в реакторах, или же гибридомные клетки вводят в организм животных и в результате получают от них асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела.

Моноклональные антитела широко используют для диагностики инфекционных болезней животных и человека бакте-

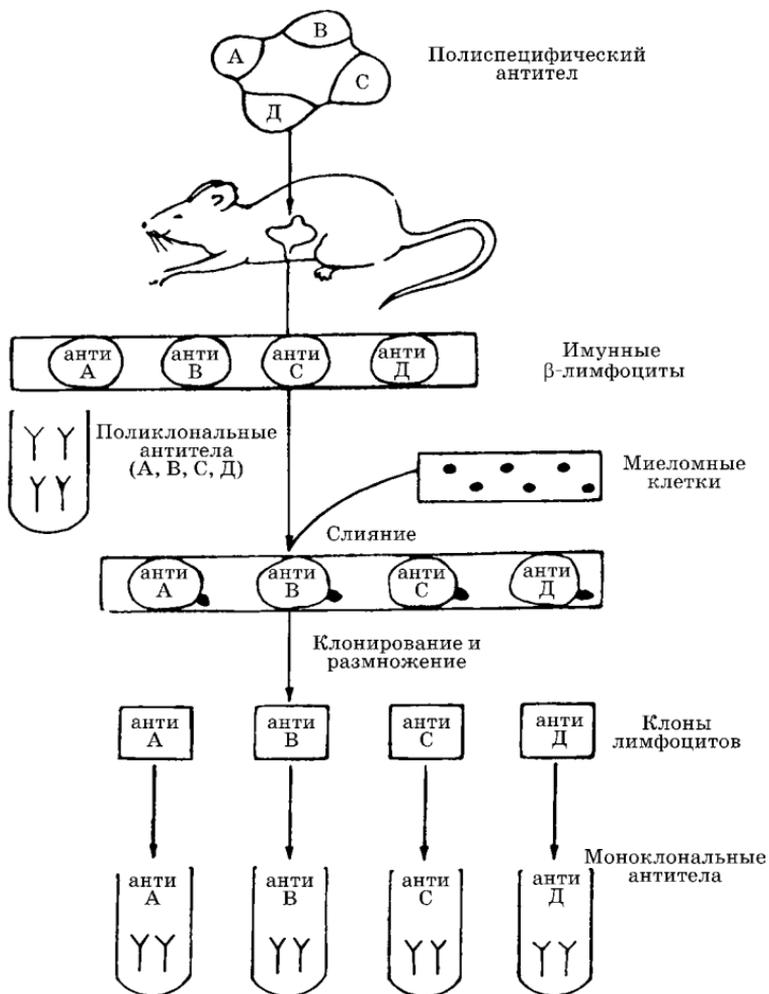


Рис. 17
 Основные этапы получения гибридом,
 синтезирующих моноклональные антитела

риальной и вирусной этиологии. Например, получены антитела против возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза, листериоза, ящра, бешенства, классической чумы свиней, болезни Ауески и др. Важно подчеркнуть, что использование моноклональных антител в радиоиммунном или иммуноферментном анализе резко повышает чувствительность и специфичность реакции.

Перспективно использование моноклональных антител для определения стельности коров по содержанию прогестерона в молоке. Для этих целей получают моноклональные антитела на прогестерон, связанный через янтарную кислоту с бычьим альбумином. Указанные антитела применяют для обнаружения прогестерона в молоке и при иммуноферментном анализе непосредственно в производственных условиях. Компонентами реакции пропитывают фильтровальную бумагу, на которую затем наносят каплю исследуемого молока, и через несколько минут определяют уровень содержания прогестерона по изменению цвета фильтровальной бумаги.

Моноклональные антитела могут быть использованы при получении вакцины генно-инженерным методом. Уже созданы такие вакцины против вируса синего языка, бруцеллеза, болезни копыт у овец, кокцидиоза. Например, вакцина против кокцидиоза готовится путем клонирования генов возбудителя *Eimeria tenella*, которые кодируют образование белковых антигенов. В результате клонирования таких генов возможно получить индивидуальные белки возбудителя в значительных количествах, что позволяет использовать их для вакцинации. Такие белки не обладают инфекционностью, стоимость их невелика. Компания «Геникс» (США), разработав клонирование генов *Eimeria tenella* и добившись их экспрессии в клетках *E. Coli*, показала, что полученные белки-антигены при введении их курам вызывают частичный иммунитет к кокцидиозу.

Моноклональные антитела можно применять в качестве лечебного средства при злокачественных опухолях, речь идет о моноклональных антителах против специфического антигена раковых клеток или возбудителя злокачественного перерождения тканей. Научные исследования в данной области проводятся очень интенсивно, и возможно, что моноклональные антитела займут достойное место среди противоопухолевых лечебных средств.

11.3.4. СИНТЕЗ И ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ

Антитела вырабатывают плазматические клетки селезенки, лимфатических узлов, костного мозга, пейеровых бляшек. Плазматические клетки (антителопродуценты) происходят из предшественников β -клеток, после их контакта с антигеном.

β -клетки и их потомки функционируют по клональному принципу: по мере развития иммунного ответа они дифференцируются, пролиферируют и созревают. Механизм синтеза антител аналогичен синтезу любых белков. Синтез молекул антител происходит на полирибосомах. Легкие и тяжелые цепи, из которых состоит молекула антител, синтезируются раздельно, затем соединяются на полирибосомах, а окончательная сборка происходит в пластинчатом комплексе. Одна плазматическая клетка может переключаться с синтеза IgM на синтез IgG.

При первичном иммунном ответе в антителообразовании различают две фазы: индуктивную (латентную) и продуктивную. Первая фаза — период от момента парентерального введения антигена до появления лимфоидных антиген-реактивных клеток; продолжительность ее не более суток. В эту фазу происходят пролиферация и дифференцировка лимфоидных клеток в направлении синтеза иммуноглобулина класса M. Во вторую фазу (примерно 10–15 сут) кривая нарастания уровня антител резко возрастает, при этом уменьшается число клеток, синтезирующих IgM, и нарастает продукция IgA.

Антитела способны реагировать с антигеном благодаря наличию у них определенных структур, которые называют **активным центром**. Это полость или щель, соответствующая пространственной конфигурации детерминантной группы антигена. Последняя же определяется последовательностью аминокислот переменных участков легких и тяжелых цепей антитела. Активный центр, куда входит определенной формы и жесткости детерминантная группа, должен быть ей комплементарен, без чего не наступит феномен серологической специфичности. Молекулы антител различных классов различают по валентности, то есть по количеству у них активных центров. Так, IgG и IgA бивалентны (обладают двумя активными центрами), IgM поливалентен — может связать 5–10 молекул антигена, так как обладает 10 активными центрами.

Предполагают, что соединению антигена и антитела способствуют: гидрофобное взаимодействие, водородные связи, кулоновы силы между группами ионов с противоположным зарядом, вандерваальсовы силы, которые действуют на очень близком расстоянии.

Активность связывания антител с антигеном оценивают по аффинитету и avidности. **Аффинитет** характеризует уровень сродства антитела к испытуемому антигену, степени совпадения (комплементарности) конфигураций активного центра антитела и антигенной детерминанты (подобно ключу в замочной скважине). Под **avidностью** понимают количество (валентность) и расположение активных центров, характеризующие «жадность» связывания с антигеном всей молекулы антитела. Чем выше avidность иммунной сыворотки, тем слабее склонность агрегатов к диссоциации. Отмечено, что один и тот же антиген вызывает образование антитела с различным уровнем аффинитета и avidности. Высокоаффинные антитела образуют более прочные комплексы с антигеном, чем низкоаффинные. Avidность зависит как от аффинности, так и от валентности, приходящейся в среднем на одну молекулу антител. При равной аффинности avidность больше, чем avidность IgG, поскольку IgM функционально пентавалентен, а IgG двухвалентен.

11.4. ФОРМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «АНТИГЕН — АНТИТЕЛО»

Знание механизмов взаимодействия антигенов с антителами раскрывает сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных агентов. Механизм реакции антигена с антителом объясним на основе современных представлений о наличии у антигенов нескольких детерминантных групп и двух активных центров в молекуле антитела.

Детерминантные группы антигена несут электрический заряд. В процессе индукции синтеза антител они так или иначе определяют специфичность формирующихся антител. Концевые части полипептидных цепей имеют заряд, противоположный заряду детерминантной группы антигена. Полярные группы антигена и антитела, обладающие противоположными зарядами, соединяются между собой. Прочность образовавшегося комплекса зависит от количества реагирующих групп и полноты совпадения структуры полярных групп антигена и антитела. Чем больше реагирующих групп и чем полнее совпадение структуры полярных групп, тем прочнее соединение, и наоборот (см. рис. 18).

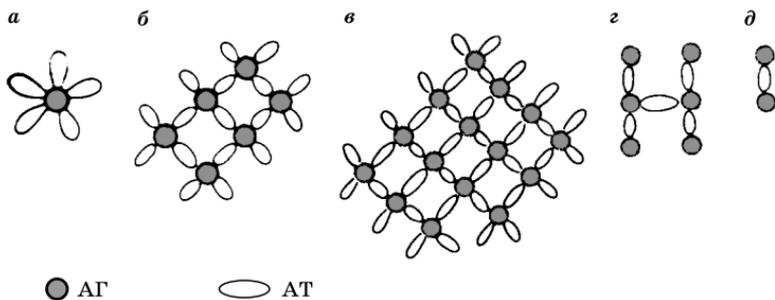


Рис. 18

Структура агрегатов АГ-АТ и их молекулярные соотношения:

а — 5:1; б — 3:1; в — 2,5:1; г — 1:1,25; д — 1:2.

При оптимальном соотношении антигена с антителом происходит полное взаимное насыщение всех валентностей, и образуются прочные комплексы, выпадающие в осадок. При избытке антител часть активных центров остается свободной и образование комплекса задерживается. В случае избытка антигена возникают рыхлые комплексы и замедляется выпадение осадка. При максимальном избытке антигена, когда связаны все активные центры антитела, образование комплексов прекращается, и осадок не выпадает.

Специфичность антител, обуславливающая механизм их взаимодействия с антигеном, связана с конфигурацией активных центров, которые должны строго соответствовать детерминантным группам антигена.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии, первая — специфическая (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой), вторая — неспецифическая, когда отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс «антиген — антитело» выпадает в осадок. Неспецифическая стадия, как правило, возможна в присутствии растворов электролитов и визуально проявляется по-разному, в зависимости от физического состояния антигена. Если антигены корпускулярные, имеет место феномен **агглютинации** — склеивания различных химических частиц, сенсibilизированных антигенами, и клеток, в том числе микроорганизмов. Образующиеся конгломераты выпадают в осадок, при этом микробные клетки морфологически заметно не меняются:

теряя подвижность, они остаются живыми. Антитела, участвующие в реакции агглютинации, называют **агглютинидами**, антигены — **агглютиногенами**, а образующийся агрегированный комплекс — **агглютинатом**. Поскольку антигенная структура микробов разнообразна, в их агглютинации принимают участие антитела разной специфичности. Тождественность детерминантных участков антигенов микробов разных видов обеспечивает групповые реакции агглютинации с гетерологичными иммунными сыворотками.

Когда в реакции с антителами участвуют растворимые (молекулярные) антигены — белки или их комплексы с углеводами и липидами разного происхождения, бактериальные экстракты, лизаты и фильтраты бульонных культур, наблюдается феномен **преципитации** — осаждение антигена. Образующийся осадок носит название **преципитата**, антитела — **преципитинов**, а антигены — **преципитиногенов**.

Реакция, происходящая между антителами и антигеном и начинающаяся быстрым соединением детерминантной группы антигена со специфическим активным центром антитела (1-я стадия), осложняется далее образованием длинных цепей из чередующихся молекул антигена и антител, а также разветвлением этих цепей (2-я стадия), далее происходит образование решетки «антиген — антитело».

Необходимое условие для образования решетки — наличие более трех антигенных детерминант на каждую молекулу антитела. Существует несколько вариантов соединения молекул антител с молекулами антигена (рис. 18). Молекулы антигена представляют собой узлы решетки, а молекулы антител — связующие звенья. В зоне избытка антител часть антигенсвязывающих участков свободна, и формирование комплекса приостанавливается. Область оптимальных соотношений (зона эквивалентности) концентраций антигена и антител — это когда в надосадочной жидкости после образования осадка не обнаруживают свободные антигены и свободные антитела. В зоне избытка антигена комплекс «антиген — антитело» растворяется, так как свободные и связанные в решетку молекулы антигена конкурируют между собой за двухвалентные молекулы антител, в результате чего решетка распадается на ряд растворимых комплексов.

Окончательное формирование системы «антиген — антитело» протекает намного медленнее, чем 1-я стадия реакции. Это неспецифический процесс, в который могут включаться различные посторонние белки, захватывающиеся решетчатой структурой «антиген — антитело» и неспособные диффундировать сквозь узкие петли этой решетки в надосадочную жидкость. Скорость образования решетки зависит от температуры, ионной силы раствора и других условий. Оптимальные условия для реакции «антиген — антитело» *in vitro* следующие: температура — 0–37°C; ионная сила — 0,005–0,1 и рН 6,4–8,6.

Механизм реакций преципитации и агглютинации, при которых иммунный комплекс выпадает в осадок, вполне объясняет теория решетки. В ходе реакции преципитации решетка формируется непосредственно в растворе, а при агглютинации бактериальных клеток решетка «антиген — антитело» образуется на самих клетках.

О характере соединения антигена с антителом судят, применяя различные методы.

Метод изучения активного центра (метка по сродству), основанный на реакции гаптена со специфическими антидетерминантами, выявляет пептидные цепи, участвующие в построении активного центра антител.

Методом рентгеноструктурного анализа была раскрыта структура активного центра антител, формирующаяся из гипервариабельных участков вариабельных доменов. При этом не было получено прямых данных, указывающих на изменение формы активного центра после присоединения к нему антигена.

Электронная микроскопия — один из важнейших методов не только изучения общей конформации молекул иммуноглобулинов, но и исследований комплексов антител с антигенами. Этим методом было выяснено, что комплексы «антиген — антитело» имеют кольцеобразную, перекрывающуюся или решетчатую структуру.

Антитела класса IgG образуют с антигеном, как правило, кольцеобразные комплексы. Электронные микрофотографии иммунных комплексов, образованных при помощи «антиген — антитело», интерпретировать сложно.

11.5. КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ (КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ)

Специфический клеточный иммунитет включает образование популяции антигенспецифических Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа, обладающих способностью специфически распознавать антиген, вызвавший их появление, взаимодействовать с ним и выполнять при этом различные эффекторные функции.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие клетки принимают участие в развитии иммунного ответа?
2. Как осуществляется регуляция иммунного ответа?
3. Как осуществляется генетический контроль иммунного ответа?
4. Какие клетки участвуют в реакциях клеточного иммунитета?
5. Какие существуют медиаторы клеточного иммунитета?
6. Назовите формы специфических реакций на введенный антиген.
7. Что такое антиген, каковы его основные свойства?
8. Какими свойствами обладают полноценные и неполноценные антигены?
9. Какие антигены имеют микроорганизмы?
10. Что такое протективные антигены?
11. Что такое гуморальный иммунитет?
12. Дайте определение антител (иммуноглобулинов).
13. Что такое полные, неполные и нормальные антитела?
14. Как классифицируются антитела по функциональным свойствам?
15. Что означают термины «аффинитет» и «авидность антител»?
16. Как происходит синтез и динамика образования антител?
17. Дайте определение понятия «иммунологическая память».
18. Какие теории образования антител вы знаете?

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ

**МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ
ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ**

ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

12.1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Бактериологическая диагностика начинается с взятия, консервирования и транспортировки патологического материала и включает три этапа исследования:

1) микроскопические исследования исходного материала позволяют обнаружить наличие в нем возбудителя, изучить его морфологические особенности и тинкториальные свойства;

2) бактериологические исследования проводятся с целью выделения чистой культуры возбудителя с установлением его морфологических, тинкториальных, культурно-биохимических свойств, а в ряде случаев — антигенной структуры;

3) биологические исследования (постановка биопробы) проводятся путем заражения лабораторных животных, которое позволяет определить вирулентность возбудителя, а также выделить его в чистой культуре.

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

12.2. МИКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Микологическая диагностика сводится к микроскопии первичного исследуемого материала; выделению чистой культуры возбудителя с использованием специальных питательных сред и определению его родовой и видовой принад-

лежности; определению патогенных и токсических свойств на биологических моделях.

При микозах в лабораторию направляют соскобы с кожи с захватом волос на границе со здоровой тканью, соскобы со слизистых оболочек ротовой полости, молоко, трупы птиц и мелких животных и др.

При микотоксикозах направляют пробы кормов (солома, сено, зернофураж, комбикорм, отруби и др.), рвотные массы; от трупов — желудок, кишечник с содержимым, паренхиматозные органы и др.

12.3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ (ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Реакции между антигенами и антителами *in vitro*, имеющие диагностическое значение, называют **серологическими** (от *лат. serum* — сыворотка), так как источником антител служила сыворотка крови. При появлении методов иммунохимического анализа серологические реакции стали частью широкого набора реакций, выявляющих механизмы взаимодействия между антигенами и антителами. Если на разных этапах развития иммунологии в качестве антител для постановки серологических реакций использовали только сыворотку крови, теперь благодаря разнообразным методам выделяют из нее высокоочищенные иммуноглобулины. Для индикации и количественной оценки того или иного вещества антигенной природы предложены способы получения высокоспецифичных (моноспецифичных) антител и высокочувствительные методы регистрации концентрации отдельных компонентов реакции «антиген — антитело». Это стало возможным в связи с разработкой способов конъюгирования антигенов и антител с флуоресцирующими красителями и ферментами, введения компонентов реакции «антиген — антитело» на различных типах носителей. Достижения современной иммунохимии позволили проводить данные реакции на уровне, который вряд ли можно назвать серологическим, хотя источником антител продолжает оставаться сыворотка

крови. Понятие «серологическая реакция» окончательно отпадает, когда речь заходит о взаимодействии антигена с моноклональными антителами, получаемыми благодаря разработке гибридомной техники, и когда реакция «антиген — антитело» протекает при аллергии.

Антитела в зависимости от свойств антигена и условий взаимодействия с ним обладают нейтрализующим, иммобилизующим, коагулирующим (осаждающим) и лизирующим (растворяющим) действиями. Нейтрализующее действие проявляется в реакциях нейтрализации токсина антитоксином, иммобилизующее — в иммобилизации некоторых микроорганизмов, коагулирующее — в реакциях агглютинации и преципитации, лизирующее — в реакциях лизиса и связывания комплемента. Каждая из разновидностей серологических реакций имеет свои варианты, а их постановка — различные модификации, поэтому методики проведения реакций между антигеном и антителом довольно разнообразны.

12.3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Реакция нейтрализации (РН). В ходе реакции нейтрализации специфические антитела нейтрализуют вредное действие антигена, которое проявляется при попадании последнего в организм. Если антигеном служит микробный экзотоксин (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.), то специфические антитела нейтрализуют его. В организме происходит нейтрализация только свободного, не связавшегося с клетками токсина. Обезвреживание токсина в ходе физико-химической реакции нейтрализации происходит за счет связывания его свободных аминок групп, что приводит к потере токсичности. Если антигеном служит вирусный материал, нейтрализующие антитела полностью подавляют специфическую активность вируса, выявляемую в различных клеточных культурах, куриных эмбрионах и на подопытных животных. Вирус перестает размножаться, теряет свою инфекционность.

Реакции агглютинации (РА). Различают прямую, непрямую, или пассивную агглютинации. В прямой агглютинации в качестве антигена выступает сама микробная клетка или структурные компоненты ее поверхностной оболочки. Предел чув-

ствительности реакции агглютинации микробов составляет 0,01 мкг азота белка антител в 1 мл.

Агглютинация обусловлена в большей степени особенностями строения клеточной оболочки и ее функциями, нежели свойствами агглютининов. Fab-фрагменты антител могут блокировать антигенные детерминанты, не приводя непосредственно к склеиванию. Агглютинации способствует расположение антигенных рецепторов клеточной поверхности в виде скоплений. Если многовалентные агглютинины взаимодействуют одновременно с несколькими антигенными рецепторами, константа K_a повышается по сравнению со случаями соединения антигена с антигеном единичной связью.

При пассивной агглютинации растворимые антигены (белки, полисахариды и их комплексы микробного происхождения) соединяются с нерастворимым носителем, выполняющим исключительно индикаторную функцию. Носителями могут быть эритроциты, частицы латекса, полиакриламида бентонита и др. Связывание антигена с носителем происходит в результате адсорбции или химического взаимодействия. Микробные полисахариды, например, адсорбируются на нативных эритроцитах без какой-либо их предварительной обработки. Различные белки (в том числе микробные фрагменты) можно присоединить к эритроцитам, только обработав их различными химическими веществами, обладающими дубильным действием, — танином, хромахлоридом формальдегидом или бисдиазотированным бензидином. Такая обработка предотвращает разрушение эритроцитов, возможное при непосредственном их контакте с антигеном. Агглютинация происходит при условии, если антиген, связанный с носителем, соответствует антителу.

Реакция преципитации (РП). Реакция «антиген — антитело» представлена преципитацией, которая основана на осаждении антигена из раствора специфическими антителами. Комплекс «антиген — антитело» выпадает в осадок только при определенных соотношениях концентраций реагирующих молекул. Область этих соотношений, при которых в надосадочной жидкости после образований преципитата не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, называется зоной эквивалентности. Вне этой зоны, при избытке антител или антигена, феномен преципитации не происходит, так как образуется

растворимый комплекс «антиген — антитело». Реакция преципитации менее чувствительна, чем реакция агглютинации.

Существуют модификации данной реакции. Самый простой способ постановки — кольцепреципитация, которую выполняют в пробирках путем наслоения на иммунную сыворотку различных разведений прозрачного раствора антигена. На границе двух реагирующих систем через определенное время появляется опалесцирующее серо-белое кольцо преципитации. Именно таким образом при изучении стерильных фильтратов бульонных культур возбудителей холеры, брюшного тифа, чумы, сибирской язвы и соответствующих антисывороток в конце XIX в. (1897) были обнаружены преципитины.

Реакция преципитации может быть поставлена в агаровом геле (иммунодиффузия по Ухтерлони): растворимые антигены и антитела вносят в лунки, вырезанные в геле на определенном расстоянии. Компоненты реакции диффундируют в слое агара навстречу друг другу, образуя в зоне контакта преципитат в виде мутной видимой линии преципитации.

Для более детальных иммунологических исследований применяют метод иммуноэлектрофореза, предложенный П. Грабаром и К. А. Уильямсом (1953). Вначале осуществляют электрофоретическое разделение антигена, представляющего собой зачастую смесь белковых или других молекул в забуференном агаровом геле. После разделения в канавку, которая идет в направлении миграции антигенных веществ, вносят преципитирующую сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дугообразные линии преципитации. По числу, положению и форме этих линий дают заключение о составе исходной смеси антигенов.

Реакция лизиса (РЛ). Лизирующее (растворяющее) действие антител наглядно проявляется в реакциях лизиса и связывания комплемента. В основе реакций лизиса лежит взаимодействие корпускулярных антигенов со специфическими антителами. Иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты, из которых выходит гемоглобин, и реагирующая смесь из мутной взвеси эритроцитов преобразуется в прозрачную красную жидкость — так называемую лаковую кровь. Реакция названа реакцией гемолиза. Когда иммуноглобулины (также при

содействии комплемента) разрушают оболочку бактериальной клетки, наблюдается лизис бактерий — бактериолизис.

Реакция связывания комплемента (РСК). Механизм действия наиболее сложный в сравнении с другими серологическими реакциями. В РСК участвуют две системы «антиген — антитело». Для визуальной регистрации связывания комплемента основной системой «антиген — антитело» в реакцию дополнительно вводят вторую, или индикаторную систему, состоящую из взвеси эритроцитов и соответствующей антисыворотки (гемолитической сыворотки). Если основной комплекс «антиген — антитело» фиксировал в себе комплемент (в случае соответствия антигена антителу), то гемолиз отсутствует (положительная реакция). Если в основной системе антиген и антитело не соответствуют друг другу, то комплемент фиксируется на втором индикаторном комплексе, вызывая гемолиз эритроцитов (реакция отрицательная). По чувствительности РСК примерно соответствует реакции пассивной геагглютинации.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). В основу иммунофлуоресцентного метода положено взаимодействие антигена с антителом, при котором один из компонентов реакции (чаще антитело) обладает способностью к вторичной флуоресценции благодаря предварительному соединению с флуоресцентным красителем. Образовавшиеся таким образом иммунные комплексы становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами на темном фоне под флуоресцентным микроскопом. В качестве флуоресцентных красителей используют флуоресцеин, изотиоцианат, родамин, β -изотиоцианат, лиссамин-родамин и другие, имеющие реакционно-способные группы (сульфохлорид, изотиоцианат и др.), которые соединяются со свободными аминокетильными группами молекул антител, не теряя при обработке флуорохромами специфического связывания с соответствующим антигеном.

12.3.2. ПРЯМОЙ И НЕПРЯМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

Прямой метод основан на непосредственном специфическом соединении антигена с мечеными антителами; **непрямой** — на поэтапном выявлении комплексов «антиген — антитело» с помощью флуоресцентных красителей. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена

(например, бактериальной клетки) со специфическими антителами (γ -глобулинами) иммунной сыворотки, второй — в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым анти- γ -глобулином.

Обнаружение иммуноглобулинов иммунофлуоресцентным методом возможно, если антиген, использованный *in vitro* для образования антител, представляет собой растворимый белок. В этом случае он может быть конъюгирован с флуорохромом и в таком виде использоваться для обнаружения гомологичных антител.

12.3.3. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

В основу метода положена конъюгация антитела или гаптена с ферментом, которая не приводит к утрате антителом или гаптенем специфичности, а ферментом — каталитической активности. Однако в составе комплекса «антиген — антитело» конъюгаты «гаптен — фермент» или «антитело — фермент» теряют каталитическую активность.

Соединение молекул антигена с ферментом осуществляется с помощью глутаральдегида — бифункционального реагента, взаимодействующего с ε -аминогруппами белковых молекул. В качестве фермента успешно применяют в зависимости от модификации метода либо пероксидазу, β -галактозидазу, щелочную и кислую фосфатазы (реже ацетилхолин, глюкоамилазу), либо лизоцим, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу и малатдегидрогеназу. Используемый для маркировки антител фермент не должен присутствовать в исследуемых клетках, содержащих антиген.

Иммуноферментные методы первоначально были разработаны для гистохимических исследований. Принцип иммуногистохимического анализа с использованием ферментов заключается в следующем. Антитела, маркированные ферментом, соединяются со специфическим антигеном, фиксированным на твердом носителе (полистироловая пластина или другие непористые полимеры), образуя невидимый комплекс. Выявление содержащих фермент иммунных комплексов проводится с помощью цветной реакции, происходящей при добавлении ферментспецифического субстрата. Окрашенный комплекс «антиген — антитело» выявляется в световой или электронной микроскопии.

В дальнейшем методы иммуноферментного анализа стали применять для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. Были созданы гетерогенные (твердофазные) и гомогенные методы, которые принципиально отличаются способом разделения компонентов иммунохимической реакции. Гомогенный метод характеризуется протеканием реакции «антиген — антитело» в гомогенном растворе, и этап физического разделения реагентов и продуцентов реакции необязателен. Твердофазные методы основаны на применении антител (или антигенов), иммобилизованных на нерастворимых носителях, гомогенные методы — на эффекте модуляции антителами активности фермента, связанного с антигеном, в их основу положен принцип конкурентного взаимодействия меченого и не меченого гаптена с активными центрами антител. Чем больше свободного гаптена введено в реакцию до прибавления меченого гаптена, тем меньшее количество последнего будет связано с антителами. Соответственно и ферментативная активность в растворе изменится незначительно. Наоборот, чем меньше свободного гаптена ввести в реакцию, тем большее количество ковалентного соединенного с ферментом гаптена уйдет в иммунный комплекс, а ферментативная активность в растворе существенно понизится.

Определение неизвестной концентрации гаптена в образце осуществляют по заранее выведенной калибровочной кривой, для построения которой устанавливают зависимость активности фермента в данной системе от стандартных концентраций свободного гаптена.

В твердофазном иммуноферментном анализе наряду с конкурентными методами распространены подходы, основанные на последовательном взаимодействии фиксированных на носителе иммуноглобулинов с антигеном (или наоборот), а затем с иммуноферментным конъюгатом, представляющим собой меченые ферментом антитела против иммуноглобулинов.

12.3.4. РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (РИА)

В радиоиммунологическом анализе специфичность реакции «антиген — антитело» сочетается с высокой чувствительностью, обеспечиваемой применением радиоактивной метки, благодаря которой можно определить количество азота антител до

$1 \cdot 10^{-8}$ мг/мл. Для проведения анализа необходимо иметь антисыворотки и гомологичные антигены, маркированные каким-либо изотопом йода (125, 131), равно как и гаптены, маркированные ^{14}C или ^3H . Чувствительность метода существенно возрастает при использовании высокоаффинных антител с низкой перекрестной реактивностью и антигенов с высокой удельной радиоактивностью.

В основу радиоиммунологического анализа положен принцип конкурентного взаимодействия определяемого не меченого антигена и известного количества меченого антигена с активными центрами антител. При этом происходит вытеснение меченого антигена или гаптена из его комплекса с антителом вследствие последующего добавления больших концентраций не меченого антигена или гаптена той же специфичности. Реакция (при высоком разведении ингредиентов) подчиняется закону действующих масс: происходящее вытеснение пропорционально введенному количеству не меченого антигена или гаптена. Конкуренцию между определяемым и меченым антигенами можно оценить количественно с помощью радиометрии, предварительно отделив образовавшиеся иммунные комплексы от несвязавшегося меченого антигена. Концентрацию определяемого антигена рассчитывают, исходя из сравнения соотношений свободного и связанного меченых реагентов с соответствующим стандартом.

12.4. ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Сущность полимеразно-цепной реакции заключается в том, что молекулу ДНК подвергают температурному плавлению, т. е. нагреванию до $90\text{--}94^\circ\text{C}$, что ведет к денатурации — разрушению водородных связей между азотистыми основаниями двойной спирали, а затем охлаждают (отжиг) до 52°C в присутствии праймера, фермента ДНК-полимеразы и всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Последующее повышение температуры до $70\text{--}72^\circ\text{C}$ приводит к синтезу новой молекулы ДНК, комплементарной матричной. Эту процедуру (плавления, отжига и синтеза ДНК) повторяют многократно, в результате чего количество выбранного фрагмента ДНК увеличивается.

Продолжительность реакции определяется числом циклов, необходимых для синтеза ДНК-амплификата в количестве, достаточном для дальнейшего исследования или индикации. Индикация производится с помощью электрофореза или с помощью меченого ДНК-зонда.

12.5. ДНК-ЗОНДЫ (ДНК-ГИБРИДИЗАЦИИ)

Метод ДНК-зондов основан на уникальном свойстве генетического материала организма — молекулы ДНК, состоящей из мононуклеотидов, образовывать двойную спираль путем комплементарного соединения азотистых оснований. Молекула ДНК образует двойную спираль, при которой азотистые основания первой цепи строго комплементарно соединяются водородными связями с азотистыми основаниями второй цепи, где аденин соединяется с тиминном, гуанин — с цитозином.

12.6. КЛЕТочНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ТЕСТЫ Т-СИСТЕМЫ ЛИМФОЦИТОВ

При культивировании лейкоцитов при определенных условиях нормальные лимфоциты периферической крови могут превращаться в недифференцированные зародышевые клетки типа бластов. Процесс превращения лимфоцитов на искусственной питательной среде в различные промежуточные формы получил название **реакции бласттрансформации (РБТЛ)**.

Морфологическая трансформация лимфоцитов может быть индуцирована специфическим и неспецифическим стимуляторами. Неспецифический стимулятор представляет собой фитогемагглютинин (ФГА). Под его воздействием обычно через 72 ч наблюдается отчетливая трансформация лимфоцитов в большие морфологические примитивные клетки, часть которых находится в состоянии митоза. Используется для оценки функции лимфоцитов и т. д.

Оценку трансформации и пролиферации лимфоцитов под влиянием специфических антигенов применяют в основном для диагностики аллергии.

Показатель повреждаемости нейтрофилов (ППН). В сенсibilизированном организме элементы белой крови, в том числе нейтрофилы, проявляют повышенную чувствительность к аллергену. Учитываемый критерий повреждения нейтрофилов — усиление амебоидной реакции этих лейкоцитов при инкубации крови в смеси со специфическим аллергеном. Для повышения точности наблюдения за поврежденными нейтрофилами используют чисто химический метод окраски клеток на гликоген по А. Л. Шабадашу, который позволяет точнее отдифференцировать нейтрофильные лейкоциты от других форменных элементов крови (эозинофилы, лимфоциты и моноциты содержат значительно меньше гликогена, а в эритроцитах он отсутствует) и обнаружить даже минимальные повреждения нейтрофилов в виде амебоидных реакций.

Количество обнаруживаемых поврежденных нейтрофилов, например в присутствии туберкулина у больных туберкулезом, находится в прямой зависимости от степени активности специфического процесса (процент поврежденных нейтрофилов в активной фазе туберкулеза в 1,5–3,5 раза выше, чем при затихании процесса).

Сегментоядерные нейтрофилы претерпевают аллергическую перестройку значительно раньше, чем наружные кожные покровы.

Реакция специфического лейколиза основана на повреждении — разрушении лейкоцитов под влиянием аллергена; первично повреждаются лимфоциты, а остальные лейкоциты — вторично.

Механизм специфического лейколиза заключается в воздействии аллергена на лимфоциты сенсibilизированного организма. Реакция служит для диагностики аллергических состояний у животных.

Реакция ингибиции и миграции лейкоцитов основана на подавлении миграции макрофагов и лейкоцитов под действием медиаторов, вырабатываемых сенсibilизирующимися лимфоцитами в присутствии специфического антигена.

Специфическое розеткообразование: β -лимфоциты животного, иммунизированного гетерогенными эритроцитами, способны *in vitro* фиксировать на своей поверхности соответствующие эритроциты, образуя «розетки». Реакция получила на-

звание «иммуноцитоприлипание». Воспроизводится *in vitro*, если сенсibilизированные лимфоциты смешивают со взвесью танализованных эритроцитов, на которых фиксируются соответствующие аллергены.

Фагоцитарная активность лейкоцитов. Ведущую роль в фагоцитозе играют нейтрофильные гранулоциты и макрофаги. Активность нейтрофильных гранулоцитов можно установить несколькими методами, принимая во внимание следующее:

- способность к адгезии — определение количества клеток, фиксирующихся на стеклянной пластинке при 37°C;
- миграцию — выход нейтрофильных гранулоцитов из капилляров в окружающую ткань (метод «кожного окна»);
- хемотоксис — способность клеток перемещаться в направлении химического градиента;
- фагоцитарную активность — способность захватывать и уничтожать бактерии.

Тест на активность наиболее полно характеризует функциональные способности нейтрофильных гранулоцитов и широко применяется для оценки уровня клеточной неспецифической резистентности.

При постановке фагоцитарной реакции учитывают три показателя:

- активность фагоцитоза (фагоцитарный показатель, процент фагоцитоза) — процент фагоцитарных бактерий;
- интенсивность фагоцитоза (фагоцитарный индекс, фагоцитарное число) — среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофильным гранулоцитом;
- завершенность фагоцитоза (индекс переваривания) — отношение числа погибших микробных клеток к живым в мазке или снижение интенсивности роста микробов после контакта их с кровью.

Реакция бесубстратного восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) основана на уникальной способности фагоцитов утилизировать кислород с образованием высококорреактогенных свободных радикалов. НСТ-тест принадлежит к чувствительным индикаторам нормы и патологии и помогает разграничить острые бактериальные и вирусные инфекции.

12.7. БИОСЕНСОРЫ

В последние годы разрабатываются экспресс-методы анализа, характеризующиеся высокой доступностью, и, вместе с тем, обладающие достаточными уровнями чувствительности и избирательности. Особый интерес вызывает возможность миниатюризации подобных аналитических устройств. Наиболее яркими представителями аналитических систем, сочетающих в себе перечисленные качества, являются биосенсоры.

Идея создания такого рода устройств существует уже около 30 лет. Впервые ее высказали, по-видимому, Л. Кларк и Х. Лионс в 1967 г. Идея Кларка состояла в использовании ферментного электрода, то есть электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. За прошедшие десятилетия эта идея получила достаточное развитие. Создано и исследовано много систем, некоторые получили апробирование и промышленную реализацию.

Большинство биосенсоров ориентированы на анализ биологических жидкостей. Так, в крови находятся тысячи различных соединений. Задача заключается в том, чтобы быстро и эффективно определить концентрацию нужного соединения, например, глюкозы. Биосенсоры обеспечивают такую возможность. Для людей, страдающих диабетом, это жизненно важный клинический анализ.

В данном устройстве чувствительный слой содержит биологический материал: ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органеллы, рецепторы; ДНК, непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, — биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический преобразователь, или биотрансдьюсер, выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее, информацию о химических связях, в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры. В данном случае реали-

зается принципиально новый способ получения информации о химическом составе раствора. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой точностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т. д. (отсюда и название — безреагентные методы анализа).

Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, трансдьюсеры на поверхностных акустических волнах и т. п. В настоящее время наибольшее распространение получили электрохимические преобразователи. Одни из них генерируют потенциал на специальном электроде, на поверхность которого нанесен слой биоматериала, другие — электрический ток реакции продукта превращения определяемого вещества на поверхности электрода, вызванного биоматериалом, т. е. существуют потенцио- и амперометрические биосенсоры. Если физический преобразователь использует изменение светопоглощения в области биослоя, то такой биосенсор называется, например, оптоволоконным, поскольку измеряемый сигнал будет передаваться измерительному прибору по оптическому волокну. Соответствующий физический преобразователь по аналогии с электродом называют оптродом. По названию преобразователя можно сделать вывод о характере физического свойства, которое измеряется аппаратно, причем, как правило, при таком измерении используется микропроцессорная техника, позволяющая сделать устройство достаточно компактным.

12.8. БИОЧИПЫ

Технология белковых биочипов, заменяющих целые иммунологические лаборатории, дает возможность в тысячи и десятки тысяч раз увеличить производительность большинства диагностических методов — за короткое время определять несколько тысяч аллергенов, онкогенов, различных биологически активных веществ, и даже генетических дефектов — и резко снизить себестоимость анализов.

Прообразом современных «живых чипов» послужил саузерн-блот, изготовленный в 1975 г. Э. Саузерном. Он использовал

меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности среди фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке. В России ученые начали активно разрабатывать тему биочипов только в конце 1980-х гг. в институте молекулярной биологии под руководством А. Д. Мирзабекова.

Биочип представляет собой матрицу — пластинку со стороной 5–10 мм, на которую можно нанести до нескольких тысяч различных микротестов; ее еще называют платформой. Чаще всего используют стеклянные или пластиковые платформы, на которые наносятся биологические макромолекулы (ДНК, белки, ферменты), способные избирательно связывать вещества в анализируемом растворе.

В зависимости от того, какие макромолекулы используются, выделяют различные виды биочипов, ориентированные на разные цели. Основная доля производимых в настоящее время биочипов приходится на ДНК-чипы (94%), т. е. матрицы, несущие молекулы ДНК. Оставшиеся 6% — белковые чипы.

Биологические микрочипы во многом схожи с электронными: и те, и другие собирают и обрабатывают огромное количество информации на малой поверхности. И те, и другие состоят из огромного количества идентичных миниатюрных элементов, размещенных рядом друг с другом, хотя ячейки биочипа по полупроводниковым меркам просто огромны. При этом действие электронного чипа основано на ответе «да — нет», а биологический чип позволяет выбрать из миллионов или миллиардов возможностей единственно верную. Компьютерный чип производит миллионы математических операций в секунду, но и на биочипе за пару секунд проходят тысячи биохимических реакций.

Разработанный в России биочип — это стеклянная пластинка, на которую нанесены десятки едва видимых глазом полусферических гидрогелевых ячеек диаметром менее 100 микрон каждая, и содержащих известные вещества-маркеры. При взаимодействии биочипа с исследуемым образцом, предварительно обработанным светящимся (флуоресцентным) красителем, в соответствующих ячейках происходит химическая реакция, и тогда эти ячейки начинают светиться — тем сильнее, чем интенсивнее процесс.

Принцип действия биологических чипов основан на способности комплементарных оснований образовывать химические

связи: в ходе реакции происходит взаимодействие комплементарных цепей ДНК, одна из них (ДНК-проба) с известной последовательностью нуклеотидов зафиксирована на подложке (пластине), а другая одноцепочечная ДНК-мишень (зонд), меченная флуоресцентной меткой, вносится в ДНК-чип.

По сути, именно в выявлении и сопоставлении наиболее ярко светящихся ячеек и заключается работа прибора-анализатора биочипов. Так определяются различные характеристики образца, например, присутствие в организме тех или иных возбудителей инфекций или наличие в геноме каких-либо измененных генов.

Особенность российских биочипов в том, что их ячейки заполнены гелем трехмерной структуры. Такие гели удерживают большее количество пробы, нежели двумерные, и потому чувствительность отечественных биочипов выше, а, следовательно, ниже требования к регистрирующей аппаратуре. Немаловажно и то, что реакции в объемном геле протекают так же, как и в жидкостях, а значит, как и в живом организме. Это позволяет получить результат, максимально приближенный к реальности.

На Западе исследователи пошли по другому пути и разработали для создания ДНК-чипов процесс фотолитографии, аналогичный процессу производства кремниевых процессоров. Например, Affimetrix (США) создал GeneChip-технология, основанную на высокоплотных чипах, содержащих ДНК-последовательности, и предназначенную для анализа генетической информации человека. Такие чипы обладают гораздо большей емкостью, стоят значительно дороже, что пока позволяет использовать их исключительно в крупных исследовательских центрах или в коммерческих клиниках.

Еще одним методом конструирования биочипов является использование «технологии струйного принтера» для нанесения необходимого нуклеотида в строго определенное место матрицы. Он менее дорог, но при этом не позволяет достичь высокой скорости синтеза.

Сейчас число размещаемых на российском биочипе ячеек достигает уже нескольких тысяч, однако чаще используются биочипы с гораздо меньшим числом ячеек. Тем не менее простой чип может выявить все известные на сегодняшний день

формы возбудителя туберкулеза, а также определить, каким именно антибиотиком нужно лечить конкретную форму — и не в течение нескольких недель, как традиционным способом, а всего нескольких суток.

При помощи белковых чипов с молекулами, «чувствительными» к различным низкомолекулярным соединениям, уже в самое ближайшее время можно будет определить наличие широкого спектра лекарственных веществ, гормонов, наркотиков, ядов, пестицидов практически в любом анализируемом материале.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое реакции иммунитета?
2. В чем заключается сущность реакции агглютинации?
3. Какие варианты реакции преципитации существуют?
4. Охарактеризуйте реакцию связывания комплемента.
5. Что такое метод флюоресцирующих антител?
6. В чем сущность иммуноферментного метода?
7. Опишите особенности радиоиммунологического анализа.
8. Что такое реакции иммунитета?
9. В чем заключается сущность реакции агглютинации?
10. Дайте определение радиоиммунологического анализа.

ГЛАВА 13. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнология возникла в древности (примерно 6000–5000 лет до н.э.), когда люди научились выпекать хлеб, варить пиво, готовить сыр и вино. Этот первый этап развития биотехнологии был сугубо эмпирический и продолжал оставаться таким, несмотря на совершенствование технологических процессов и расширение сфер использования биотехнологических приемов, вплоть до открытия Л. Пастером в XIX в. природы процесса брожения. С этого момента начался второй — научный — этап традиционной биотехнологии. В этот период были получены и выделены ферменты, открыты многие микроорганизмы, разработаны способы их выращивания в массовых количествах, получены культуры животных и растительных клеток и разработаны способы искусственного их культивирования.

В результате изучения физиологии, биохимии и генетики бактериальных и животных клеток были получены многие продукты микробиологического синтеза, необходимые для медицины, сельского хозяйства и промышленности. Сформировалась вначале техническая микробиология, а затем — биотехнология. Однако промышленное производство сводилось в основном к получению продуктов на основе природных штаммов.

На смену традиционной биотехнологии пришла новая, основанная на применении искусственно получаемых штаммов — суперпродуцентов, использовании иммобилизованных ферментов, культур животных и растительных клеток, генетической инженерии для получения клеток-рекомбинантов, моноклональных антител и других биологически активных веществ.

13.1. ПОНЯТИЕ О БИОТЕХНОЛОГИИ, ЕЕ ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Биотехнология — область знаний, возникшая и оформившаяся на стыке микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, химической технологии и ряда других наук. Ее появление обусловлено потребностями общества в новых, более дешевых продуктах для медицины и ветеринарии, а также в принципиально новых технологиях, (речь идет о получении продуктов из биологических объектов или с применением биологических объектов). В качестве объектов могут быть использованы организмы животных и человека (например, получение иммуноглобулинов из сывороток вакцинированных лошадей или людей, получение препаратов крови доноров), отдельные органы (получение гормона инсулина из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней) или культуры тканей (получение лекарственных препаратов). Однако чаще всего используют одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор этих объектов обусловлен целым рядом причин.

Клетки являются своего рода биофабриками, вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты (белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр.). Эти продукты, крайне необходимые в жизни человека, пока недоступны для получения биотехнологическими способами из-за сложности технологии процессов или экономической нецелесообразности, особенно в условиях крупномасштабного производства.

Клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся, что позволяет за относительно короткое время искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы бактериальных, животных или растительных клеток.

Биосинтез сложных веществ (белков, антибиотиков, антигенов, антител и др.) значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез. Коэффициент полезного действия работы клетки равен 70%, а коэффициент самого совершенного технологического процесса значительно ниже.

Возможное проведение биотехнологического процесса в промышленных масштабах, то есть наличие соответствующего технологического оборудования и аппаратуры, доступность сырья, технологии переработки и др.

Клетки животных и растений, бактериальные клетки в процессе жизнедеятельности (ассимиляции и диссимиляции) образуют новые продукты и выделяют метаболиты, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и биологическим действием. Обычно продукты жизнедеятельности одноклеточных делят на четыре категории:

- сами клетки как источник целевого продукта — например, выращенные бактерии или вирусы используют для получения живой или убитой корпускулярной вакцины, дрожжи — как кормовой белок или основу для получения гидролизатов питательных сред и др.;
- крупные молекулы (макромолекулы), синтезируемые клетками в процессе выращивания: ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.;
- первичные метаболиты — низкомолекулярные вещества, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты);
- вторичные метаболиты (идиолиты) — низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток (антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны).

Биотехнология использует продукцию клеток как сырье, которое в результате технологической обработки превращается в конечный продукт. С помощью биотехнологии получают множество продуктов, используемых в различных отраслях: медицине (антибиотики, витамины, ферменты, аминокислоты, гормоны, вакцины, антитела, компоненты крови, диагностические препараты, иммуномодуляторы, алкалоиды, пищевые белки, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, нуклеотиды, липиды, антиметаболиты, антиоксиданты, противоглистные и противоопухолевые препараты); ветеринарии и сельском хозяйстве (кормовой белок, кормовые антибиотики, витамины, гормоны, вакцины, биологические средства защиты растений, инсектициды); пищевой промышленности (аминокислоты, органические кислоты, пищевые белки, ферменты, липиды, сахара, спирты, дрожжи), химической

промышленности (ацетон, этилен, бутанол), энергетике (биогаз, этанол).

Следовательно, биотехнология направлена на создание профилактических и лечебных медицинских и ветеринарных препаратов; решение продовольственных вопросов (повышение урожайности, продуктивности животноводства, улучшение качества пищевых продуктов — молочных, кондитерских, хлебобулочных, мясных, рыбных); обеспечение многих технологических процессов в легкой, химической и других отраслях промышленности.

Необходимо отметить также все возрастающую роль биотехнологии в экологии, так как очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов, их градация (фенол, нефтепродукты и другие вредные для окружающей среды вещества) осуществляются с помощью микроорганизмов.

В настоящее время в биотехнологии выделяют медико-фармацевтическое, продовольственное, сельскохозяйственное и экологическое направления. В соответствии с этим биотехнологию можно разделить на медицинскую, сельскохозяйственную, промышленную и экологическую. Медицинская, в свою очередь, подразделяется на фармацевтическую и иммунобиологическую, сельскохозяйственная — на ветеринарную и биотехнологию растений, а промышленная — на соответствующие отраслевые направления (пищевая, легкая промышленность, энергетика и т. д.).

Отметим, что общепризнанное определение предмета «биотехнология» отсутствует и даже ведется дискуссия о том, наука это или производство. Видимо, правильнее определить биотехнологию как сферу деятельности, которая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, главным образом клеток микроорганизмов, животных и растений, использует эти процессы и сами объекты для промышленного производства продуктов, необходимых в жизни человека, а также для получения биоэффектов, ранее не встречавшихся в природе (например, для получения рекомбинантных бактерий, трансгенных растений и животных).

В биотехнологии сильнее, чем в любой другой области знаний, интегрируются наука и производство. Промышленное производство в биотехнологии по сути основано на нескольких

принципах: брожении (ферментации), биоконверсии (превращения одного вещества в другое), культивировании растительных и животных клеток, бактерий и вирусов, генетических манипуляциях. Реализация этих научных принципов в производстве потребовала разработки промышленного оборудования и аппаратуры, отработки оптимизации технологических процессов, разработки способов контроля продукции на всех ее стадиях.

Современная биотехнологическая промышленность — это крупные заводы, опытно-конструкторские учреждения, научно-исследовательские институты. Фундаментальными проблемами биотехнологии заняты научно-исследовательские институты РАН, РАМН и ряд прикладных отраслевых институтов.

На заводах микробиологической (биотехнологической) промышленности ежегодно производятся миллионы тонн кормового белка, десятки тысяч тонн ферментов, антибиотиков, сотни диагностических и профилактических вакцинных и иммунных препаратов, практически все аминокислоты, витамины, гормоны, спирты, органические кислоты и много другой продукции. Однако потребности быстро растущего народного хозяйства биотехнология удовлетворяет еще далеко не в полной мере, именно поэтому развитию биотехнологии в настоящее время уделяется постоянное внимание.

13.2. ПРИНЦИПЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Возникновение генетики микроорганизмов можно датировать 1940-ми гг. Первые опыты по конструированию рекомбинантных молекул ДНК вне живой клетки относятся к началу 70-х годов XX в. Таким образом, понадобилось всего 30 лет, чтобы преодолеть путь от первых опытов с грибами, бактериями и фагами в качестве генетических объектов до расшифровки тонкой структуры их генетического материала, принципов его организации и функционирования.

В течение нескольких лет были построены генетические карты *E. coli*, *S. typhimurium* и *B. subtilis*, т. е. определено расположение различных генетических локусов на хромосоме. Аналогичный путь прошла генетика бактериофагов, для которой

были разработаны методы генетического анализа и построения генетических карт. В результате этих исследований в организации генетических локусов у бактерий и бактериофагов были выявлены общие закономерности: наличие одной группы сцепления (хромосомы) и групповое расположение генетических локусов с родственными функциями.

Методы картирования генов и их мутаций снабдили исследователей точным инструментом анализа основных генетических процессов, протекающих в бактериальных клетках. Блестящих результатов достигли А. Львов и Ф. Жакоб в своих исследованиях генетического материала в процессе биосинтеза белка. На их основании была предложена первая модель оперона. Согласно концепции оперона структурные гены бактерий организованы в функциональные единицы, находящиеся под контролем генов-регуляторов. Продукты последних — репрессоры — подавляют активность структурных генов, координированно регулируя синтез их белковых продуктов. На проксимальном конце оперона расположены операторы — регуляторные участки, обеспечивающие взаимодействие с репрессорами.

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

К концу 50-х — началу 60-х годов XX в. в результате успехов генетики микроорганизмов и молекулярной биологии сформировалось новое научное направление — молекулярная генетика. Одна из наиболее ярких страниц этого периода связана с открытием и расшифровкой рестрикции и модификации ДНК. Швейцарский микробиолог и генетик В. Арбер доказал, что в клетках бактерий, ограничивающих размножение фага, синтезируются два фермента. Один из них, обозначенный как эндонуклеаза, расщепляет чужеродную ДНК, проникшую в клет-

ку. Другой, названный метилазой, модифицирует проникающую в клетку ДНК путем метилирования нескольких пар нуклеотидов, тем самым делая ДНК устойчивой к действию эндонуклеазы. Арбер сформулировал и основные принципы работы систем рестрикции — модификации, по-видимому, выработанные в процессе эволюции для защиты от проникновения неродственной ДНК.

Исследования Арбера повлекли за собой поиск ферментов рестрикции у других бактерий и обусловили разработку методов нарезания молекул ДНК на фрагменты, сыгравших решающую роль в развитии генетической инженерии.

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

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

Для того, чтобы связать достижения бактериальной генетики в манипулировании генами с методологией генетической инженерии (конструирование гена *in vitro*), рассмотрим модель репликона и ее значение для реконструирования рекомбинантных молекул ДНК. Ф. Жакоб и Ж. Моно предположили, что каждая генетическая структура, будь то хромосома, плазида или бактериофаг, составляет единицу репликации, или репликой. Репликой построен из двойной цепи ДНК, замкнутой в кольцо, и имеет генетические детерминанты, необходимые для его репликации. Последняя начинается в одном определенном участке молекулы и распространяется вдоль ее длины. Репликация хромосомы бактерии начинается с одной точки и происходит двунаправленно. Гипотеза репликона позволила объяснить известные факты, что фрагменты хромосомы, перенесенные в другие клетки с помощью трансформации, трансдукции или конъюгации, не способны самостоятельно реплицироваться и могут передаваться дочерним клеткам только после их включения в хромосому. Именно в этом и состоит значение модели репликона для генетической инженерии. Клонирование

генов может быть осуществлено только путем их включения в состав генетической структуры, обладающей собственным аппаратом репликации. Такая структура, обычно плаزمиды или ДНК фага, именуется **векторной молекулой**.

Методом генетической инженерии можно решить следующие задачи: генетически изменить микроорганизмы с целью увеличения количества вырабатываемого ими необходимого продукта (аминокислот, ферментов, полисахаридов и др.); осуществить перенос соответствующих генов млекопитающих и человека в микроорганизмы (бактерии, дрожжи) для синтеза с их помощью специфических белков, используемых в лечебно-профилактических целях (гормоны, вакцины, интерферон, ферменты, иммуноглобулины и др.); генетически изменить высшие растения для повышения их продуктивности (урожайности, калорийности, устойчивости к различным внешним факторам). Особое внимание уделяется получению растений, несущих гены азотфиксации и не нуждающихся в азотных удобрениях; генетически изменить соматические клетки человека, страдающего наследственными заболеваниями, с помощью трансформации их *in vitro* или *in vivo* рекомбинированными ДНК, содержащими неповрежденный ген (генная терапия наследственных заболеваний).

Для создания генетически измененных организмов необходимо получить индивидуальный ген, кодирующий необходимый признак. Далее — подобрать вектор — молекулу ДНК, способную к самостоятельной репликации в клетке-реципиенте, создать рекомбинантную молекулу ДНК, т. е. соединить выделенный ген с вектором и ввести в подходящую клетку-реципиент.

Следует подчеркнуть, что возможности микробиологического синтеза весьма велики, так как время деления (удвоения) бактериальной клетки составляет всего 0,3–2 ч, а скорость образования биомассы у растений и у животных меньше, чем у микроорганизмов (в 500 и 1000 раз соответственно). Одна бактериальная клетка синтезирует около 100 000 молекул белка в минуту. Современный органический синтез не обладает такой высокой производительностью.

У некоторых микроорганизмов обмен веществ направлен не на рост и размножение, а на синтез какого-либо вещества. Так, высокопродуктивный мутант для синтеза пенициллина обра-

зует за цикл развития до 0,5 кг пенициллина на каждый килограмм биомассы. Некоторые микроорганизмы могут синтезировать витамин В₁₂ в количествах, превышающих их жизненные потребности в 100–200 раз. У продуцентов витамина В₂ масса синтезированного витамина достигает 20% массы клетки. В связи с этим придается большое значение целенаправленному поиску продуцентов, т. е. выбору штамма, обладающего наивысшей продуктивностью.

Достижения молекулярной биологии по изучению роли нуклеиновых кислот в процессах жизнедеятельности привели к разработке совершенно новых методов диагностики заболеваний животных и человека на основе уникальных свойств ДНК и РНК, — это методы молекулярной гибридизации (ДНК-зонды) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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

13.3. МИКРООРГАНИЗМЫ, КЛЕТКИ И ПРОЦЕССЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

В природе существует огромное число микроорганизмов. Все они способны синтезировать продукты или осуществлять реакции, которые могут быть полезны для биотехнологии. Однако практическое применение нашли не более 100 видов микроорганизмов (бактерии, грибы, дрожжи, вирусы, водоросли), так как остальные мало изучены.

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток. Из 500 известных видов дрожжей используется только несколько видов: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*. Среди бактерий в биотехнологии чаще применяют представителей следующих родов: *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*. Например, молочнокислые

бактерии (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*) используют для сбраживания сахаров; псевдомонад, например *P. denitrificans*, — для получения витамина В₁₂; *Corynebacterium glutamatum* — аминокислот и др. Для получения разнообразных антибиотиков в биотехнологии применяют актиномицеты (род *Streptomyces*), грибы *Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium acremonium* и др.

Многие бактерии, дрожжи, вирусы используют в качестве реципиентов чужеродного генетического материала для получения рекомбинантных штаммов — продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса иммунодефицита человека; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; штаммы дрожжей, продуцирующие ИЛ-2, антиген вируса гепатита В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепатита В, вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.

Для получения вакцин и диагностических препаратов используются также патогенные микроорганизмы (брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка и др.).

Широкое применение в биотехнологии нашли культуры животных и растительных клеток. Известно, что строение, физиология и биотехнологии животных и растительных клеток более сложны, чем бактериальных клеток. Из культур животных и растительных клеток можно извлечь более широкий ассортимент сложной и ценной продукции, однако процесс культивирования трудоемкий и дорогостоящий. Из культур тканей растений можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и почечные средства, ферменты, витамины, опиаты и др.), сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности. Животные клетки используют как для получения продукции, синтезируемой клетками, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов.

Технология получения продуктов микробного или клеточного синтеза. Основное условие успешного проведения технологического процесса — выбор или получение высокопродук-

тивного штамма-продуцента и поддержание его в активном состоянии. Второе важное условие — подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление биомассы или целевого продукта. Питательные среды должны состоять из дешевого, недефицитного и доступного сырья, поскольку при промышленном культивировании микроорганизмов требуются огромные их количества. В крупномасштабном производстве питательные среды готовят обычно на сравнительно дешевом сырье (меласса, парафины нефти, дрожжи, уксусная кислота, природный газ). Более ограниченное применение, главным образом при получении медицинских препаратов, находят казеин, препараты крови, среды из мясных гидролизатов.

Для выращивания животных клеток применяют питательные среды со сложным составом. Они komponуются из высококачественного, сравнительно дорогого сырья (аминокислоты, соли, ростовые факторы). В последнее время успешно разрабатываются питательные среды для культур клеток из гидролизатов казеина, дрожжей, мышц и крови.

Для получения продукции в максимальных количествах активный штамм-продуцент выращивают на оптимальной питательной среде в оптимальных условиях культивирования (посевная доза, температура, рН окислительно-восстановительный потенциал, аэрация, массообменные характеристики, питательные и ростовые добавки, сроки культивирования). Выращивание проводят в ферментерах (культиваторах), вместимость которых в зависимости от потребности в продукте может варьироваться от 2 л до 100–400 м³. Для получения культур животных клеток объем ферментеров пока не превышает 3 м³. В настоящее время биотехнологическая промышленность оснащена ферментерами, позволяющими автоматизировать процесс. Культивирование происходит в асептических условиях, чтобы получить чистые культуры требуемых микроорганизмов или клеток.

Помимо суспензионного (глубинного) культивирования в ферментерах иногда применяют поверхностное культивирование на плотных питательных средах (бактерии, грибы) или в жидком монослое (культуры животных клеток). Последний способ осуществляется в роллерных (вращающихся) установках.

Полученную биомассу микроорганизмов или культуры клеток затем подвергают переработке, сущность которой определяется технологией получения целевого продукта. Наиболее типовые процессы — это концентрирование биомассы (сепарированием, центрифугированием) и приготовление из нее жидкого (суспензии, пасты) или сухого продукта; высушивание, проводимое лиофильным способом из замороженного состояния или путем распыления в потоке теплого воздуха в специальных лиофильных аппаратах (в том числе ленточных автоматических сушилках большой мощности) и в распылительных сушилках (процесс ведется в замкнутом цикле), которые имеют большую мощность, однако не позволяют сушить термолабильные продукты; сбор центрифугата после отделения биомассы и выделения из него целевого продукта, например антигенов, токсинов, инсулина и др. Иногда предварительно прибегают к дезинтеграции (разрушению) клеток механическим способом или с помощью ультразвука, осмоса, чтобы увеличить выход целевого продукта.

В тех случаях, когда из биомассы или центрифугата (культуральной жидкости) необходимо выделить активную субстанцию (витамин, аминокислоту, антиген, антитело, фермент и другие соединения), применяют физические или физико-химические методы очистки. Выбор их определяется свойствами выделяемого вещества: природой, молекулярной массой, лабильностью к внешним воздействиям, химическим сродством и т. д. Из физических методов на первичных стадиях чаще всего применяют сепарирование, центрифугирование (ультрацентрифугирование), из физико-химических — осаждение нейтральными солями, спиртом, ацетоном, а также ультрафильтрацию, хроматографию, электрофорез. Методы выделения и очистки, как правило, многоступенчатые. Чистоту получаемого продукта характеризуют наличием в нем примесей и выражают коэффициентом очистки — отношение числа активных единиц продуктов на 1 мл белка или азота (так называемая удельная активность) в очищенном препарате к удельной активности исходного (неочищенного) продукта.

Обычно в препаратах активная субстанция не всегда находится в предельно очищенном состоянии, поскольку при пере-

работке больших объемов сырья в производственных условиях при существующих методах очистки этого добиться пока невозможно. Именно поэтому иммунобиологические препараты, полученные традиционным методом или способом генетической инженерии, содержат, как правило, примеси питательных сред, на которых выращивали микроорганизмы, а также продукты метаболизма и неспецифические компоненты — продукты распада бактериальной клетки. К примесям относятся белки, полисахариды и их комплексы, нуклеиновые кислоты, соли и другие низкомолекулярные вещества. Они не только бесполезны для препаратов, но иногда вызывают нежелательные побочные реакции организма при их применении (местные реакции, повышение температуры тела, аллергические проявления). В принципе необходимо стремиться к получению препаратов, содержащих активную субстанцию в предельно очищенном состоянии.

После получения активной субстанции из нее конструируют конечный препарат. В соответствии с назначением и способом применения он может быть в жидком или сухом состоянии (раствор, суспензия, порошок) или в виде мазей, предназначен для наружного, парентерального или энтерального, аэрозольного применения, стерильный и нестерильный.

Конечный препарат обычно содержит, помимо примесей, от которых не удалось освободиться, необходимые добавки: консервант (антисептик для поддержания стерильности препарата при хранении), стабилизатор (обычно инертные белки, аминокислоты для повышения устойчивости лабильного активного начала при хранении), активаторы (например, адъюванты и иммуномодуляторы в вакцинах). В конечной композиции препарат фасуется (ампулы, флаконы, таблетки, мази), маркируется (этикетировается), снабжается инструкцией по применению.

Каждая серия препарата проходит стандартизацию в соответствии с технической документацией (технические условия, технологический регламент на изготовление) на производстве и в Государственном институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича или в Фармакологическом комитете, в зависимости от назначения препарата.

13.4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И ОБЛАСТЬ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Генетическая инженерия является основой биотехнологии и по существу сводится к генетической рекомбинации, т. е. обмену генами между двумя хромосомами, приводящему к возникновению клеток или организмов с двумя и более наследственными детерминантами (генами), по которым родители различались между собой. Метод рекомбинации заключается в следующем:

- выделение ДНК из разных видов организмов или клеток;
- получение гибридных молекул ДНК;
- введение рекомбинантных (гибридных) молекул в живые клетки;
- создание условий для экспрессии и секреции продуктов, кодируемых генами.

Гены, кодирующие те или иные структуры, выделяют (клонировать) из хромосом или плазмид, прицельно выщепляют из этих генетических образований с помощью ферментов рестрикции или синтезируют химически. Набор ферментов (известно более 500 рестриктаз), способных разрезать ДНК по определенным связям (сайтам), — важный инструмент генной инженерии. В последнее время обнаружены ферменты, расщепляющие по определенным связям РНК наподобие рестрикции ДНК. Эти ферменты называют рибозимами. Их роль еще пока не выяснена.

С помощью химического синтеза могут быть получены сравнительно небольшие гены. Для этого вначале расшифровывают число и последовательность аминокислот в белковой молекуле вещества и по этим данным узнают очередность нуклеотидов в гене, поскольку каждой аминокислоте соответствуют три нуклеотида (кодон). С помощью синтезатора химическим путем создают ген, аналогичный природному. Полученный целевой ген с помощью ферментов лигаз сшивают с другим геном, используемым в качестве вектора для встраивания гибридного гена в клетку. В качестве вектора могут служить плазмиды, бактериофаги, вирусы человека, животных и растений.

Число плазмид в бактериальной клетке может колебаться от одной до нескольких сотен, причем чем большие размеры

имеет плазида тем меньше ее копий в клетке. С помощью амплификации генов, то есть увеличения числа копий определенного гена в клетке, можно резко повысить производство кодируемого вещества клеткой. Амплификацией удастся добиться получения до 3000 копий плазмидных генов на клетку.

Бактериофаг как вектор используется аналогично. Целевой ген встраивается в геном фага, реплицируется вместе с генами вируса при размножении последнего в бактериальной клетке. Чаще всего используют фаг λ , содержащий ДНК, состоящую из 50 000 пар нуклеотидов. Преимущество фага λ перед плазидами в том, что фаговый вектор позволяет клонировать большие фрагменты чужеродной ДНК.

В случае использования в качестве векторов вирусов человека, животных и растений чужеродный ген встраивают в ДНК вируса, и этот фрагмент реплицируется вместе с размножением вируса в клетке. Применяют в качестве вектора космиды, представляющие гибрид плазмиды с фагом. Космиды используют для клонирования больших (до 45 000 пар нуклеотидов) фрагментов ДНК эукариот.

Для РНК-содержащих вирусов передача генетической информации возможна с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), передающей информацию о структуре белка от РНК к ДНК, которая является комплементарной мРНК.

Экспрессируемый ген в виде рекомбинантной ДНК (плазида, фаг, космида, вирусная ДНК) встраивается в бактериальную или животную клетку, которая приобретает новое свойство — способность продуцировать нехарактерное для нее вещество, кодируемое экспрессируемым геном. Для лучшего проникновения вектора через стенку бактерий иногда прибегают к воздействию на стенку (например, хлоридом кальция), чтобы увеличить ее проницаемость.

В качестве реципиентов экспрессируемого гена чаще всего используют *E. coli*, *B. subtilis*, псевдомонады, дрожжи, вирусы. Реципиента подбирают с учетом не только возможности встройки чужеродного гена, но и выраженности (экспрессии) синтеза вещества, кодируемого геном, возможности его секреции в окружающую среду, легкости и доступности массового культивирования, экологической безопасности. Некоторые штаммы рекомбинантных бактерий способны переключать на синтез

чужеродного вещества, экспрессируемого геном, до 50% своего синтетического потенциала. Такие штаммы — суперпродуценты целевых продуктов — уже получены и применяются в биотехнологической промышленности; они носят название промышленных штаммов. В качестве примера можно привести штаммы — суперпродуценты интерферона, интерлейкина, белков вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и др.

Некоторые штаммы микроорганизмов хорошо экспрессируют чужеродные гены, но плохо секретируют продукт в окружающую среду. В таких случаях приходится применять дезинтеграцию (разрушение) клетки с целью высвобождения из нее синтезированного продукта.

В некоторых случаях, несмотря на наличие экспрессии и секреции, продукт не удается получить, вернее собрать, из-за разрушения в процессе синтеза или после него протеазами и другими ингибиторами. Это прежде всего относится к низкомолекулярным пептидам.

С целью повышения уровня секреции целевого белка используют следующий прием: к гену целевого белка присоединяют ген белка, хорошо секретлируемого клеткой реципиента; образующийся в результате манипуляции химерный белок, хорошо секретлируемый клеткой, собирают и от него отщепляют целевой белок. Возможно также присоединение к гену целевого белка гена-индикатора, то есть гена, кодирующего легкоузнаваемый белок, в результате чего получают химерный индикаторный белок, а из него — целевой белок. В качестве индикатора можно использовать, например, галактозидазу.

Из многих сотен препаратов, полученных методом генетической инженерии, в практику внедрена только часть их: интерфероны, интерлейкины, фактор VIII, инсулин, гормон роста, тканевый активатор пламиногена, вакцина против гепатита В, моноклональные антитела для предупреждения отторжения при пересадке почки, диагностические препараты для выявления ВИЧ и др. Это обстоятельство можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, длительное время к этим препаратам и рекомбинантным штаммам микроорганизмов относились настороженно, опасаясь, что может произойти неуправляемое распространение экологически опасных рекомбинантных микро-

организмов, однако в наши дни эти опасения практически сняты. Во-вторых, использование рекомбинантных штаммов продуцентов предусматривает разработку сложных технологических процессов по получению и выделению целевых продуктов, что требует значительно больше средств, чем необходимо для получения штамма. В-третьих, при получении препаратов методом генетической инженерии всегда возникает вопрос об идентичности активной субстанции, вырабатываемой рекомбинантным штаммом-продуцентом, природному веществу, т. е. требуется проведение исследований, направленных на доказательство идентичности, а также иногда решение дополнительных задач по приданию продукту природного характера.

Однако метод генетической инженерии относится к числу перспективнейших при получении многих белковых биологических веществ, представляющих ценность для медицины. В области создания биологически активных веществ медицинского назначения с помощью метода генетической инженерии исследования продолжают на следующем этапе: разрабатываются препараты второго поколения, то есть аналоги природных веществ, обладающих большей эффективностью действия. При определении целесообразности и экономичности методов генетической инженерии для получения медицинских или других препаратов по сравнению с традиционными способами учитывают многие обстоятельства, прежде всего доступность этого метода, его экономичность, качество получаемого препарата, новизну, безопасность проведения работ и др.

Метод геной инженерии — единственный при получении препаратов, если природный микроорганизм или животные и растительные клетки не культивируются в промышленных условиях. Например, возбудитель сифилиса или малярийный плазмодий практически не растут на искусственных питательных средах. Именно поэтому для получения диагностических препаратов или вакцин (см. табл. 2) прибегают к клонированию или синтезу генов протективных антигенов, их встраиванию в легкокультивируемые бактерии. При выращивании этих рекомбинантных бактерий-реципиентов получают нужные антигены, на основе которых создают диагностический препарат или вакцину. Таким образом уже производится вакцина против гепатита В. Ген HBs-антигена вируса гепатита встроены в дрожжевую

**Препараты, разрабатываемые
методами современной биотехнологии**

Тип препарата	Применение
Антикоагулянты и тромболитики	Тканевый активатор плазминогена, факторы VIII и IX
Колонистимулирующие факторы	Соматомедин С, гранулоцитарный колонистимулирующий фактор, макрофагальный колонистимулирующий фактор
Иммуноцитокнины	Интерфероны, интерлейкины, фактор некроза опухолей, миелопептиды, пептиды вилочковой железы
Гормоны	Гормон роста, инсулин, эритропоэтин
Ферменты	Липазы, протеазы
Вакцины	Против ВИЧ-инфекции, гепатита В, малярии и др.
Диагностикумы	Для выявления ВИЧ-инфекции, гепатита В, сифилиса и др.
Рецепторы	T-лимфоциты (белок CD4) и др.
Моноклональные антитела (не для диагностических целей)	Для иммунотерапии опухолей, предупреждения реакций отторжения
Прочие	Триптофан, белок А, альбумин, поведенческие пептиды и др.

клетку; при выращивании дрожжей образуется HBs-антиген, из которого готовят вакцину.

Метод генетической инженерии предпочтительнее также в том случае, когда микроорганизм высокопатогенен и опасен при промышленном производстве. Например, для получения ВИЧ-диагностических препаратов и вакцин предпочитают не выращивать вирус в больших количествах, а необходимые антигены получают методом генетической инженерии. К настоящему времени практически все основные антигены ВИЧ получены путем выращивания рекомбинантных штаммов *E. coli* или дрожжей, способных продуцировать эти антигены. На основе рекомбинантных белков созданы диагностические препараты для обнаружения ВИЧ.

Метод генетической инженерии используют в том случае, когда исходное сырье для получения препарата традиционным способом дефицитно или дорогостояще. Например, лейкоцитарный α -интерферон (2–3 дозы) получают из лейкоцитов донорской крови человека (1 л). Производство лейкоцитарного интерферона методом генной инженерии значительно экономичнее, его получают путем выращивания рекомбинантных штаммов бактерий (*E. coli*, псевдомонад), способных продуцировать интерферон в результате встраивания в них гена α -интерферона. Из 1 л культуры рекомбинантных бактерий получают 100–150 доз лейкоцитарного интерферона с активностью 106 МЕ.

13.5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

В борьбе с инфекционными болезнями особое место отводят своевременной диагностике, специфической профилактики и терапии. Для этих целей биологическая промышленность выпускает различные биологические препараты, которые подразделяются на следующие группы:

- 1) вакцины;
- 2) лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины;
- 3) диагностические антигены, сыворотки и аллергены;
- 4) бактериофаги.

13.5.1. ВАКЦИНЫ

Вакцины — средства специфической активной иммунопрофилактики. Бывают живые, инактивированные, химические, анатоксины и др.

Живые вакцины готовят из штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью (аттенуированных). Главное требование, предъявляемое к вакцинным штаммам, — наличие стойкой, наследственно передающейся остаточной вирулентности. При введении таких штаммов микроорганизмов в организм культура должна приживаться и размножаться, но не вызывать клинических проявлений болезни, что приводит к созданию иммунитета высокой напряженности и длительности.

Вакцинные штаммы получают различными способами.

1. Использование аттенуированных (с ослабленной вирулентностью) штаммов, возникших в естественных условиях обитания возбудителей инфекционных болезней.

2. Искусственное получение аттенуированных штаммов возбудителей в лабораторных условиях:

- выращивание возбудителя на искусственных питательных средах;
- перевод возбудителя на другой вид восприимчивого животного;
- перевод возбудителя на невосприимчивый вид животного.

3. Ослабление вакцинных штаммов прямым (непосредственным) воздействием на ген возбудителя мутагенами физической природы (проникающая радиация, ультрафиолетовое излучение, пониженная или повышенная температура и др.).

4. Комбинированные методы получения вакцинных штаммов в лабораторных условиях.

Для приготовления вакцин аттенуированные штаммы возбудителей культивируют на специальных питательных средах в реакторах, куриных эмбрионах или культурах клеток и тканей. Полученную биомассу очищают от балластов и после проверки на безвредность, микробную загрязненность и активность в соответствии с общепринятыми методами используют для иммунизации животных и птиц.

Живые вакцины имеют ряд преимуществ перед вакцинами других типов: главное из них — высокая иммуногенность, то есть создание иммунитета высокой напряженности и длительности, приближающегося к постинфекционному; однократная иммунизация; возможность введения естественными путями и др. Среди недостатков живых вакцин следует отметить: необходимость соблюдения мер предосторожности при их транспортировке и хранение при температуре 4–10°C; поствакцинальные реакции и осложнения; реверсия вирулентности; после вакцинации бактериальными вакцинами нельзя применять в течение 7 сут антибактериальные препараты.

В настоящее время биопромышленность выпускает живые вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза, бруцеллеза, туляремии, листериоза, рожи свиней, сибирской язвы и др.

Для приготовления инактивированных вакцин в качестве вакцинного штамма используют высоковирулентные и иммуногенные штаммы микроорганизмов, выращенные в жидких питательных средах в котлах-реакторах; выход бактериальной массы с плотных питательных сред незначительный. По истечении срока культивирования бактериальную массу собирают и инактивируют. Последовательность этих операций определяется методом выращивания культур микробов. Так, при использовании жидких питательных сред культуру возбудителя вначале инактивируют в том же реакторе, где производилось выращивание, а затем микробную массу отделяют от жидкой фракции центрифугированием. Если применяют плотные питательные среды, то выросшую на них культуру смывают физиологическим раствором в стерильные бутылки, в которых ее инактивируют.

Для инактивации микроорганизмов сочетают различные физические факторы (нагревание) и химические вещества (формалин, фенол и др.), в основном формалин. Количество добавляемого формалина должно быть небольшим (от 0,2 до 0,5%, при температуре 37°C в течение нескольких недель), так как в более высокой дозе он отрицательно действует на антигенную структуру микроорганизмов.

Стандартизацию инактивированной взвеси культуры микроорганизмов проводят путем сравнения с эталонами различной мутности, фотометрически подогнанными к мутности взвеси бактерий определенной концентрации. Приготовленную взвесь культуры проверяют на стерильность, безвредность и активность.

Для повышения эффективности инактивированных вакцин применяют депонирующие средства, на которых микробные тела адсорбируются (алюминиевые квасцы, гидроксид алюминия), или их эмульгируют в минеральных маслах. Добавление депонирующих веществ к инактивированным культурам необходимо для создания «депо» на месте введения препарата, что способствует длительному воздействию микробного антигена на организм животного и обуславливает более высокий уровень образования антител.

Все инактивированные препараты должны быть стерильными. Для контроля на стерильность используют различные

питательные среды, которые обеспечивают надежное выявление аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов и дрожжей. При нахождении бактерий приготовленные препараты уничтожают.

Важнейшим элементом контроля на безвредность является проверка вакцины на лабораторных животных и тех, для которых она предназначена. Обычно для этого используют от 3 до 5 животных на каждую серию изготовленной партии; одновременно проводят проверку на лабораторных животных.

Вакцина безвредна, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов и ухудшения их общего состояния. Одним из наиболее важных свойств вакцины является ее иммуногенность. Иммуногенность препаратов определяют следующим образом: животных, обладающих чувствительностью к микробам, из которых приготовлены вакцины, иммунизируют этими препаратами. Через определенные промежутки времени (14–21 сут) иммунным и контрольным животным вводят установленную дозу культуры микроба (LD 50, или смертельная доза), затем наблюдают за ними в течение определенного периода времени (сроки зависят от особенностей возбудителя). При заболевании (или гибели) контрольных животных иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми.

Химические вакцины применяют для профилактики инфекционных болезней, это антигены и антигенные комплексы, извлеченные из микробных культур и в той или иной степени очищенные от балластных неиммунизирующих веществ. В отдельных случаях извлеченные антигены являются в основном бактериальными эндотоксинами, полученными в результате обработки культур различными способами. Это могут быть «протективные антигены», продуцируемые некоторыми микробами в процессе жизнедеятельности в организме животных или в специальных питательных средах при соответствующих режимах культивирования (например, протективный антиген сибиреязвенных бацилл).

Рекомбинантные вакцины. Используя методы генной инженерии, можно создавать искусственные генетические структуры в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Рекомбинантная молекула ДНК с новой генетической информацией вводится в клетку реципиента с помощью переносчиков

генетической информации (вирусы, плазмиды), которые называются векторами.

Получение рекомбинантных вакцин включает несколько этапов:

- клонирование генов, обеспечивающих синтез необходимых антигенов;
- введение клонированных генов в вектор (вирионы, плазмиды);
- введение векторов в клетки-продуценты (вирусы, бактерии, грибы);
- культивирование клеток *in vitro*;
- выделение антигена и его очистка или применение клеток-продуцентов в качестве вакцин.

Специфическая активная профилактика болезней, вызываемых токсинообразующими микроорганизмами, основана на применении биопрепаратов типа анатоксинов, изготавливаемых путем специфической обработки биомассы и обезвреживания экзотоксинов. **Анатоксины** — аналоги неактивированных вакцин — препараты обезвреженного токсина, очищенного от балластных веществ, сконцентрированного и адсорбированного (чаще на алюмокалиевых квасцах). Введение в анатоксин адсорбента имеет цель повысить его иммуногенные свойства. Основным методом перевода экзотоксина в состояние анатоксина был успешно разработан французским иммунологом Г. Рамоном (1923), который установил, что прибавление к токсину формалина в небольших количествах и выдерживание при 37°C в течение месяца лишает его токсичности с сохранением иммунизирующей активности. Примером служит столбнячный анатоксин.

В практике широко применяют убитые вакцины, в частности:

- концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец;
- концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против брадзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят;
- анатоксинвакцину против инфекционной энтеротоксемии овец;
- концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против рожи свиней;

- преципитированную формолвакцину против геморрагической септицемии крупного рогатого скота, овец и свиней;
- полужидкую формолвакцину против пастереллеза крупного рогатого скота и буйволов;
- поливалентную вакцину против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных;
- формолквасцовую вакцину против паратифа поросят;
- концентрированную формолквасцовую вакцину против паратифа телят;
- концентрированную поливалентную формолквасцовую вакцину против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии телят;
- концентрированный квасцовый столбнячный анатоксин, поливалентную вакцину против колибактериоза и паратифа телят, поросят, пушных зверей и птиц.

Поливалентные вакцины готовят из нескольких вариантов одного вида микроорганизмов. **Ассоциированные вакцины** содержат антигены разных видов возбудителей.

13.5.2. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Изготовление лечебно-профилактических иммунных сывороток и иммуноглобулинов осуществляет биологическая промышленность. В качестве продуцентов иммуносывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию осуществляют нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента на последний.

По окончании цикла иммунизации, когда в сыворотке крови продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных берут кровь. Чаще это делают на 10–14-е сутки после введения продуценту последней дозы антигена.

Из крови выделяют сыворотку общепринятыми методами и стерилизуют ее через бактериальные фильтраты или методом тиндализации. В качестве консервантов используют 0,25–0,5% -е растворы фенола, 0,01–0,03% -е растворы тиомерсала (мертио-

лята) или другие. Контроль на стерильность сыворотки проводят по общепринятой методике высевами из препарата на питательные среды (МПА, МПБ с глюкозой, МППБ и на агар Сабуро).

Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Они должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Специфическую активность сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы инфекционного агента или токсина, тем выше ее активность.

На каждую проверенную серию сыворотки заполняют паспорт, в котором указывают основные показатели: биофабрику, изготовившую сыворотку, название препарата, номер серии, дату изготовления, метод консервирования, титры, сроки и способы хранения; на этикетке указывают лечебные и профилактические дозы в зависимости от вида и возраста животных. Вводят сыворотку обычно внутримышечно или внутривенно.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, так как они создают лишь временный пассивный иммунитет. Иммунитет наступает в ближайшие часы после введения сыворотки (2–3 ч) и не превышает 2–3 нед.

В ветеринарии применяют следующие сыворотки: поливалентная антитоксическая сыворотка против паратифа телят, ягнят, овец и птиц; поливалентная антитоксическая сыворотка против колибактериоза телят, поросят, ягнят; гипериммунная сыворотка против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней; сыворотка против рожи свиней; антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец; сыворотка против диплококковой септицемии телят, ягнят, поросят; антитоксическая противостолбнячная сыворотка.

Сыворотка реконвалесцентов — это сыворотка крови переболевших животных, содержащая специфические антитела, применяется с лечебной и профилактической целями. Ее рекомендуется получать и применять в одном и том же хозяйстве. Кровь от животных-доноров берут непосредственно в хозяйстве или во время убоя их на мясокомбинате.

Диагностические иммунные сыворотки получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (возбудителем). В большинстве случаев продуцентами сывороток являются лабораторные животные (кролики, морские свинки), петухи и реже лошади. Готовые сыворотки проверяют на стерильность, активность и специфичность. Все диагностические сыворотки содержат специфические антитела к определенному антигену.

Диагностические сыворотки применяют в серологических реакциях в следующих целях: для нахождения возбудителя болезни в патологическом материале (сибирская язва и др.); при определении вида (серогруппы, серовара, патовара) возбудителей инфекции, выделенных в чистой культуре (сальмонеллез, бруцеллез, листериоз и др.); в качестве заведомо положительного контроля при постановке любой серологической реакции.

Из диагностических сывороток готовят иммуноглобулины общепринятыми методами.

Имуноглобулины. Важнейшей составной частью сыворотки крови являются белки, основная масса которых представлена альбуминами и глобулинами.

Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки, в которой методом электрофореза обнаружены α -, β - и γ -глобулины. При гипериммунизации животных в сыворотке крови увеличиваются γ - и β -глобулиновые фракции. В настоящее время белки, синтезирующиеся в организме в ответ на антигенное раздражение и обладающие свойством антител, обозначают термином «иммуноглобулины». Отметим, что эти белки неоднородны, поэтому с целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования последних.

Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них активных белковых фракций — иммуноглобулинов — и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител.

Препараты иммуноглобулинов, содержащие γ - и β -глобулиновые фракции сыворотки крови, намного превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из нативной сыворотки.

В настоящее время выпускают специфические иммуноглобулины против бешенства, столбняка, сибирской язвы и др. Иммуноглобулины вводят подкожно или внутримышечно в дозах 0,5–2,0 мл/кг массы тела.

Антитоксические сыворотки — это сыворотки, в состав которых входят антитела (иммуноглобулины), способные специфически связывать и нейтрализовать токсины микробного, растительного и животного происхождения. В целом же данным термином называют гипериммунные сыворотки, содержащие эти антитела.

Антитоксины применяют для профилактики и лечения столбняка, ботулизма, злокачественного отека. Сыворотки вводят на ранних сроках заболевания. Антитоксинотерапия неэффективна, если клинические признаки болезни уже четко выражены, так как антитоксины не оказывают лечебного действия и могут лишь предотвратить развитие интоксикации. Как и у всех иммуноглобулинов, их действие не превышает 2–3 нед.

13.5.3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АНТИГЕНЫ И АЛЛЕРГЕНЫ

Принцип и методика приготовления антигена аналогичны приготовлению инактивированных вакцин.

Антигены, как и другие диагностические препараты, готовят на биофабриках (биокомбинатах); они содержат убитые целые микробные клетки или экстракты, полученные из соответствующих микроорганизмов.

В ветеринарии для диагностики инфекционных болезней используют следующие антигены:

1) единый бруцеллезный антиген для РА, РСК (РДСК) — биомасса из вакцинного штамма 19, выращенная на обогащенном печеночном агаре, которую инактивируют нагреванием и устанавливают концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту до 10 млрд/мл;

2) бруцеллезный антиген для кольцевой реакции с молоком (КР) — взвесь убитых нагреванием бруцелл, окрашенных в синий цвет гематоксилином;

3) бруцеллезный антиген для РА на стекле (роз-бенгал) — суспензия убитых нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым;

4) стандартный сибиреязвенный антиген для РП — экстракт из убитых нагреванием бацилл вирулентного штамма сибирской язвы;

5) сальмонеллезные антигены;

6) цветной антиген для диагностики пуллороза — тифа птиц и сальмонеллеза водоплавающих птиц;

7) антиген листериозный;

8) сапной антиген;

9) антиген вибриозный (кампилобактериозный);

10) антиген для диагностики микоплазмоза птиц в сыворочно-капельной реакции агглютинации;

11) антигены для диагностики лептоспироза в реакции макроагглютинации.

Аллергены в качестве диагностических препаратов представляют собой экстракты из бактериальной массы. Их выпускают биофабрики (биокомбинаты).

Указанные препараты используют при аллергической диагностике туберкулеза (туберкулин), паратуберкулеза (паратуберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сапа (маллеин), туляремии (тулярин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне (в течение 6–8 нед.). Затем культуру стерилизуют в автоклаве, упаривают до 1/10 объема, отслаивают, фильтруют через бактериальные фильтры (Зейтца) и добавляют 50% -й раствор глицерина. Контроль качества аллергена включает установление стерильности и специфической активности. Последнюю проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

13.5.4. БАКТЕРИОФАГИ–ВИРУСЫ

Обладают способностью проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их лизис. Источником фагов патогенных микробов служат больные и переболевшие животные и люди, выделяющие с фекалиями фаги во внешнюю среду.

Фаг получают путем добавления в котлы с бульонными бактериальными культурами производственного фага. После вы-

держивания при 37°C в течение суток культуры фильтруют через бактериальные фильтры. Фильтрат проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность.

Учитывая высокую специфичность действия бактериофагов на гомологичные им организмы, для дифференцирования и индикации некоторых видов бактерий с успехом применяют соответствующие фаги (например, при сибирской язве, паратифозных инфекциях и др.). Разработана фагодиагностика многих инфекционных болезней (бруцеллез, пастереллез, сальмонеллез, колибактериоз и др.), а также фаготерапия и фагопрофилактика.

Фагодиагностику можно использовать при санитарно-бактериологических исследованиях объектов окружающей среды для обнаружения бактериофага в воде, почве в качестве показателя их загрязнения соответствующим фагу микробом.

Биологическая промышленность выпускает следующие диагностические бактериофаги: сибиреязвенный, листериозный, бруцеллезный, стафилококковые бактериофаги для типирования штаммов.

13.6. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ (БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ)

Метод используют с целью длительного хранения микроорганизмов и биопрепаратов, он заключается в обезвоживании биологических объектов при низких температурах под вакуумом, то есть вода удаляется из замороженного материала путем испарения льда, минуя жидкую фазу. Лиофилизированные биопрепараты сохраняют длительное время свои первоначальные свойства и легко растворяются в воде.

Лиофильная сушка биопрепаратов происходит в два этапа:

- 1) жидкие биопрепараты, разлитые по ампулам или флаконам, замораживают при температуре $-40...-60^{\circ}\text{C}$;
- 2) замороженные препараты переносят в сушильную камеру и создают глубокий вакуум, ампулы или флаконы быстро запаивают или закупоривают, предварительно создавая в них вакуум, или заполняют инертным газом.

13.7. ПРАВИЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ, ИХ ТРАНСПОРТИРОВКА

Эффективность биологических препаратов во многом зависит от соблюдения правил применения, режима и условий их хранения. В работе с биопрепаратами необходимо действовать в соответствии с рекомендациями и наставлениями по их применению. Соблюдение условия хранения биопрепаратов гарантирует стабильность иммуногенных свойств, их высокую активность и специфичность. Повышенные требования предъявляют к хранению и транспортировке живых аттенуированных вакцин, так как разгерметизация флаконов, как правило, приводит к инаktivации вакцинных штаммов. Сухие биопрепараты имеют ряд существенных преимуществ, так как они сохраняют свои свойства в довольно широком диапазоне температур.

Вакцины, содержащие в своем составе депонирующие вещества, перед применением необходимо интенсивно взбалтывать до получения равномерной взвеси.

Эмульгированные вакцины, содержащие минеральные масла, перед введением необходимо подогреть в водяной бане при 36–37°C, а затем тщательно взболтать. Совершенно недопустимо замораживание жидких вакцин. Использованию подлежат биопрепараты только с неистекшим сроком годности, без наличия хлопьев и различного рода осадков, плесени, помутнения, видимых внешних повреждений флаконов.

При растворении сухих биопрепаратов применяют только указанный в наставлении разбавитель. Живые вакцины, оставшиеся после проведения вакцинации, подлежат уничтожению кипячением.

Все флаконы и ампулы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку. Хранят и транспортируют прививочные средства при условиях, не влияющих на их макроскопический вид, специфические свойства в течение срока годности.

В производственных условиях биопрепараты хранят в холодильных установках с определенным микроклиматом или на

специальных складах (в подвалах). Помещения (склады) должны быть сухими, темными и прохладными, с равномерной в течение всего года температурой от 2 до 15°C. Для каждого вида препарата должно быть выделено оборудованное определенное место или отделение (полка, шкаф). Воспрещается совместное хранение годных и выбракованных препаратов.

Помещение для хранения препаратов должно быть закрыто, а ключ должен находиться у ответственного лица, которое в специальной книге ведет строгий учет поступления и расходования.

Биопрепараты выбраковывают при отсутствии на флаконах этикеток, повреждении упаковки, просачивании препарата через пробку, промерзании, наличии посторонних примесей, плесени, пленок, комочков, гнилостного запаха, изменений установленной консистенции и цвета. Браковку препаратов проводят комиссионно с участием ветеринарного врача. Уничтожение забракованных препаратов проводят при составлении акта путем автоклавирования или кипячения.

Транспортировку больших партий биопрепаратов в зимнее время производят в обогреваемых вагонах или на обогреваемых автомашинах.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое биотехнология?
2. Чем объяснить предпочтительное использование микроорганизмов в биотехнологических технологиях?
3. Изложите схематично технологию получения продуктов микробного (клеточного) синтеза.
4. В чем сущность применения генной инженерии в биотехнологии?
5. Классифицируйте биопрепараты по целевому назначению.
6. Какие требования предъявляют к живым аттенуированным вакцинам, их преимущества и недостатки?
7. Какие требования предъявляют к инактивированным вакцинам?
8. На что направлен контроль вакцин?
9. Как готовят лечебно-профилактические сыворотки?
10. Перечислите требования, предъявляемые к диагностическим сывороткам и иммуноглобулинам.
11. Какие диагностические антигены, аллергены и бактериофаги вы знаете?
12. Кто осуществляет контроль качества выпускаемых биопрепаратов?

РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ
**ЧАСТНАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ
И МИКОЛОГИЯ**

ГЛАВА 14. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

14.1. ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КОККИ

Кокки — широко распространенная в природе группа шаровидных сапрофитных, реже патогенных бактерий. Принадлежат к семействам *Micrococcaceae* и *Deinococcaceae*.

Патогенны для животных главным образом бактерии родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Обитают в организме животных, на коже и слизистых оболочках дыхательных, пищеварительных и мочеполовых путей. Многие кокки — представители нормальной микрофлоры организма.

14.1.1. СТАФИЛОКОККИ

Стафилококки (*Staphylococcus*) — сферические грамположительные неподвижные аспорогенные бактерии рода *Staphylococcus* из семейства *Micrococcaceae*. Открыты в 1880 г. независимо друг от друга Л. Пастером и А. Огстоном и более детально изучены Ф. Розенбахом в 1884 г.

В 1976 г. Международным комитетом по таксономии стафилококков официально утверждены следующие три вида: *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*. К настоящему времени описано 23 вида стафилококков, изолированных от животных и человека.

Стафилококки имеют важное значение в инфекционной патологии животных, так как практически любой орган и любая ткань могут быть поражены этими микробами. Они вызывают фурункулы, абсцессы, флегмоны, остеомиелиты, маститы, эндометриты, бронхиты, пневмонии, менингиты, пиемии и сеп-

тицемии, энтероколиты, пищевые токсикозы, стафилококкоз птиц.

Морфология. Стафилококки — сферические клетки диаметром 0,5–1,5 мкм. В препаратах из гноя и молодых бульонных культур располагаются одиночно, парами или небольшими кучками; в мазках из агаровых культур — в виде отдельных скоплений неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Жгутиков и капсул не имеют; споры не образуют. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями.

Культивирование. Факультативные анаэробы. Хорошо растут на универсальных питательных средах при 35–40°C, оптимум рН 7,0–7,5. Добавление к питательной среде глюкозы или крови ускоряет рост стафилококков. Характерное свойство большинства штаммов — способность расти в присутствии 10% хлорида натрия и 40% желчи.

На МПА образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными краями диаметром 2–3 мм. Колонии могут быть окрашены, так как стафилококки вырабатывают нерастворимые в воде пигменты, относящиеся к каротиноидам. Наиболее интенсивно пигменты образуются при росте на агаре с 10% обезжиренного молока после 24-часовой инкубации при 37°C и на картофеле при 20–25°C в аэробных условиях на свету. *S. aureus* синтезирует золотистый или оранжевый пигмент, встречаются и беспигментные штаммы; *S. epidermidis*, как правило, синтезирует пигмент белого или желтого цвета; у большинства штаммов *S. saprophyticus* пигментобразование отсутствует.

Рост в МПБ сопровождается диффузным помутнением с последующим выпадением рыхлого хлопьевидного осадка. В столбике желатина после засева уколом через 36–48 ч наряду с обильным ростом по линии укола намечается начальное разжижение среды, которое затем увеличивается, и к 4–5-м суткам образуется воронка, наполненная жидкостью. На кровяном агаре патогенные штаммы стафилококков образуют значительную зону гемолиза эритроцитов.

Биохимические свойства. Стафилококки ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, глицерин, маннит и не разлагают дульцит, салицин, инулин, раффинозу. Выделяют аммиак и сероводород,

не образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты; продуцируют каталазу, фосфатазу, уреазу, а патогенные штаммы — аргиназу. Свертывают и пептонизируют молоко, разжижают желатин, иногда свернутую сыворотку крови. Однако протеолитическая активность у стафилококков в значительной степени варьирует.

Факторы патогенности. Патогенные стафилококки синтезируют и секретируют высокоактивные экзотоксины и ферменты. Среди экзотоксинов выделяют четыре типа гематоксинов (стафилолизин), лейкоцидин и энтеротоксины.

К гематоксинам относятся α -, β -, γ - и δ -гемолизины. Все стафилококковые гемолизины — мембранотоксины: они способны лизировать мембраны клеток эукариотов.

α -гемолизин вызывает лизис эритроцитов овец, свиней, собак, обладает летальным и дерматонекротическим действием, разрушает лейкоциты, агрегирует и лизирует тромбоциты.

β -гемолизин лизирует эритроциты человека, овец, крупного рогатого скота, летален для кроликов.

γ -гемолизин обнаруживают у штаммов, выделенных от человека, его биологическая активность низка.

δ -гемолизин вызывает лизис эритроцитов человека, лошадей, овец, кроликов, разрушает лейкоциты.

Лейкоцидин — негемолитический экзотоксин, вызывает дегрануляцию и разрушение лейкоцитов.

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

Основная роль в инфекционной патологии животных и человека принадлежит *S. aureus*, в меньшей степени — *S. epidermidis* и в отдельных случаях — *S. saprophyticus*.

Пигментообразование и расщепление углеводов не может служить критерием патогенности стафилококков. Главный фактор, определяющий патогенность этих бактерий, — способность продуцировать экзотоксины и ферменты коагулазу, фибринолизин и гиалуронидазу, ДНК-азу. Коагулаза — бактериальная

протеиназа, свертывающая плазму крови животных. Наличие коагулазы служит одним из наиболее важных и постоянных критериев патогенности стафилококков.

К стафилококкам чувствительны лошади, крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, утки, гуси, индейки, куры, из лабораторных животных — кролики, белые мыши, котята. У кроликов при внутрикожном введении культуры патогенных стафилококков развивается воспаление, а затем некроз кожи, при внутривенной инъекции фильтрата культур наступает острое отравление и гибель через несколько минут.

Антигенная структура. У стафилококков лучше всего изучены антигены клеточной стенки: пептидогликан, тейхоевые кислоты и белок А. Пептидогликан — общий видовой для стафилококков антиген. Тейхоевые кислоты — видоспецифические полисахаридные антигены. *S. Aureus* содержит рибитолтейхоевую кислоту (полисахарид А), *S. epidermidis* — глицеринтейхоевую кислоту, называемую полисахаридом В. Протеин А обнаружен у золотистого стафилококка; представляет собой низкомолекулярный белок, имеющий свойство соединяться с Fc-фрагментами IgG млекопитающих. Штаммы, продуцирующие большое количество белка А, обладают более высокой резистентностью к фагоцитозу. У мукоидных штаммов золотистого стафилококка выявлен также капсульный полипептидный антиген.

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

Многие штаммы чувствительны к антибиотикам — бензилпенициллину, полусинтетическим пенициллинам, стрептомицину, левомицетину, тетрациклину, фузидину и другим, а также нитрофурановым препаратам. Однако довольно часто встречаются и резистентные к антибиотикам штаммы. Они, как

правило, характеризуются множественной лекарственной устойчивостью, которая контролируется R-плазмидой и может распространяться путем трансдукции. Стафилококки, синтезирующие пенициллиназу (β -лактамазу), способны разрушать некоторые пенициллины. К сульфаниламидам стафилококки весьма устойчивы.

Патогенез. В организм стафилококки проникают через поврежденную кожу и слизистые оболочки, энтеротоксины — с пищей.

Стафилококковые инфекции чаще развиваются и тяжелее протекают в условиях снижения естественной резистентности организма и при иммунодефицитных состояниях, аллергии. В патогенезе стафилококковых инфекций ведущая роль принадлежит экзотоксинам и патогенным ферментам. Все эти факторы вместе и определяют характер патологического процесса: возникнут ли локальные гнойно-воспалительные очаги, системные болезни внутренних органов, сепсис или пищевые токсикозы.

Лабораторная диагностика. Исследуют раневой экссудат, гной абсцессов, ран, молоко при маститах, выделения из половых органов при эндометрите, кровь из яремной вены при септицемии.

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

Патогенные штаммы на кровяном агаре образуют вокруг колоний зону гемолиза. На чашках с молочно-солевым и на обычном МПА отмечается образование пигмента. На желточно-солевом агаре большинство патогенных стафилококков вызывает лецитовителлазную реакцию, проявляющуюся в образовании вокруг колонии зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. Для выделения чистой культуры из характерной колонии делают отсев на МПА. Чистую культуру микроскопируют, после чего ставят реакцию плазмокоагуляции с цитратной плазмой крови кролика. При наличии фермента коагулазы плазма свертывается. Дополнительно определяют ДНК-азу и ферментацию маннита в анаэробных условиях.

При необходимости выявляют летальные свойства культуры на кроликах и ставят дерматонекротическую пробу. С этой

целью в выбритый участок кожи кролика вводят внутривожно 0,2 мл 2-миллиардной взвеси культуры. В положительном случае в месте введения образуется инфильтрат и развивается некроз кожи.

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

Эпизоотологический анализ — это установление источника возникновения стафилококковой инфекции и путей ее распространения. Фаготипируют выделенные культуры с помощью международного набора стафилококковых фагов, который включает 22 типа фага, разделенных на 4 группы. Энтеротоксины в пищевых продуктах и культурах определяют в РДП со стафилококковыми антисыворотками к энтеротоксинам А, В, С, D, Е, F.

В связи с широким распространением штаммов стафилококков, резистентных к лекарственным препаратам, проводят определение чувствительности выделенных культур к антибиотикам на плотной среде методом бумажных дисков, что очень важно для назначения рациональной антибиотикотерапии.

Иммунитет. Здоровые животные обладают естественной резистентностью к стафилококковой инфекции, она обусловлена барьерной функцией кожи и слизистых оболочек, фагоцитозом и наличием специфических антител, образуемых в результате скрытой иммунизации. Распространению микробов в организме также препятствует воспалительная реакция в месте внедрения возбудителя.

Иммунитет при стафилококковых инфекциях преимущественно антитоксический, слабой напряженности и непродолжительный, что обуславливает частые рецидивы. Тем не менее высокие титры антитоксинов в крови животных повышают их устойчивость к повторным заболеваниям. Антитоксины не только нейтрализуют экзотоксины, но и способствуют быстрой мобилизации фагоцитов.

Стафилококки могут индуцировать гиперчувствительность замедленного типа. Известно, что повторные стафилококковые

поражения кожи приводят к более выраженным деструктивным изменениям.

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

14.1.2. СТРЕПТОКОККИ

Стрептококки (*Streptococcus*) — шаровидные бактерии, образующие в процессе деления цепочки (рис. 19).

Впервые их выделил из тканей людей, больных рожей, и людей, имеющих раневые инфекции, в 1874 г. Т. Бильрот, а описали при сепсисе Л. Пастер в 1879 г. и А. Огстон в 1881 г. Чистую культуру стрептококков выделили и изучили Ф. Фелейзен (1883) и А. Розенбах (1884).

Патогенные стрептококки у животных и человека заселяют слизистые оболочки, кожу и проявляют свою патогенность при снижении общей резистентности организма или отдельных его тканей (травма, ожог и др.).

В естественных условиях стрептококки являются возбудителями болезней крупного рогатого скота и лошадей, а также нагноительных процессов. У поросят, телят и птиц вызывают кишечное и септическое заболевание — стрептококкоз. Иногда обуславливают осложнения вирусных и бактериальных инфекций.

Антигенная структура. Современная классификация основана на определении антигенной структуры. Все стрептококки

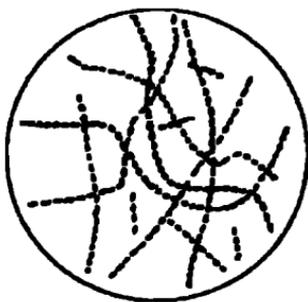


Рис. 19
Стрептококки

подразделяют на 17 серологических групп, обозначаемых латинскими буквами в порядке алфавита. Практический интерес представляют серогруппы А, В, С, D, Е, F. Группа А — возбудители большого числа инфекций у человека, В — возбудители мастита у коров; группы С, D, Е, F — возбудители инфекций у животных разных видов. Антиген, позволяющий определить серогруппу, представляет собой полисахарид

(С-вещество) клеточной стенки. Химическая природа стрептококковых антигенов неодинакова. В группе А это белковые антигены М, R и T.

Токсины и факторы патогенности. Патогенные стрептококки продуцируют экзотоксины различного действия.

Гемолизин обуславливает разрушение эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, макрофагов; при внутривенном введении кроликам вызывает гемоглобинемию и гематурию.

Лейкоцидин разрушает лейкоциты или угнетает их фагоцитарные свойства.

Летальный токсин (некротоксин) при внутрикожном введении кролику вызывает некроз кожи, а также паренхиматозных органов и других тканей.

Кроме экзотоксинов патогенные стрептококки продуцируют ферменты — гиалуронидазу, фибринолизин, дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу, нейраминидазу, протеиназу, стрептокиназу, амилазу, липазу, а также термостабильные эндотоксины. Экзотоксины отличаются термолабильностью: гемолизин инактивируется при 55°C в течение 30 мин, лейкоцидин — при 70°C. Наиболее термоустойчив фибринолизин, не разрушающийся при кипячении до 50 мин.

Мыт — контагиозное заболевание преимущественно молодняка цельнокопытных животных (до двух лет), характеризующееся катарально-гнойным воспалением слизистой оболочки верхних дыхательных путей, подчелюстных и заглоточных лимфатических узлов. Возбудитель — *Streptococcus equi* — открыл Щютц в 1888 г.

Морфология. Мазки окрашивают по Граму и Романовскому — Гимзе. Для *Str. equi* в гное (мытный абсцесс, носовое истечение) характерно расположение длинными цепочками сплюснутых в поперечнике кокков; в мазках из агаровой и бульонной культур цепочки короткие, иногда из двух кокков. Мытный стрептококк спор не образует, неподвижен, величина отдельных кокков 0,6–1,0 мкм, грамположительный.

Культивирование. Чистую культуру выделяют на сывороточно-глюкозном агаре (на обычных средах не растет). Через 24 ч на агаре мытный стрептококк образует мелкие, просвечивающиеся, похожие на капельки росы колонии. Характерная особенность — слияние колоний между собой.

На кровяном агаре образует мелкие колонии с зоной β -гемолиза, на свернутой кровяной сыворотке *Str. equi* — стекловидные сероватые колонии. В сывороточном бульоне и среде Китта — Тароцци отмечается рост в виде мелких крупинок, выстилающих стенки и дно пробирки; бульон остается прозрачным.

Биохимические свойства. Мытный стрептококк не свертывает простое молоко, лакмусовое и метиленовое молоко не обесцвечивает (не редуцирует), не ферментирует лактозу, сорбит, маннит. Отсутствие ферментации названных углеводов позволяет дифференцировать мытный стрептококк от гноеродного (*Str. pyogenes*), который сбраживает лактозу, свертывает молоко, редуцирует метиленовую синь.

Токсинообразование. Выражено слабо. Антигенная структура. *Str. equi* принадлежит к серогруппе С. Содержит полисахарид С, синтезирует экстрацеллюлярные антигены (токсины), О-стрептолизин (белок) и S-стрептолизин (липидно-протеиновый комплекс), способные вызывать разрушение эритроцитов.

Устойчивость. Во влажном гное сохраняется до 6 мес, в навозе — один месяц.

При нагревании до 70°C погибает в течение 1 ч, при 85°C — за 30 мин. В качестве дезинфектантов используют 1% -й раствор формалина, 3% -й раствор гидроксида натрия при экспозиции 10–30 мин.

Патогенность. Мытом болеет молодняк цельнокопытных животных. Стрептококки, попавшие на слизистую оболочку носа, лимфогенным путем достигают подчелюстных лимфатических узлов. Под влиянием кокков и их токсинов возникает воспаление слизистой оболочки, вначале серозное, а потом слизисто-гнионое.

Мытный стрептококк, выделенный непосредственно из гноя, вирулентен для жеребят, но культуры данного стрептококка, свежевыделенные на сывороточном или кровяном агаре, невирулентны. Токсинообразование выражено слабо.

Патогенез. Возбудитель проникает в слизистую оболочку носоглотки и лимфатические узлы. Большая часть микробов погибает. Сам микроб и его токсины вызывают серозно-катаральное и затем гнионое воспаление слизистой носоглотки. Ее отечность и болезненность затрудняют прием корма и воды.

Воспаленные подчелюстные лимфоузлы быстро увеличиваются, абсцедируют и вскрываются. При доброкачественной форме воспалительные явления вскоре исчезают, истечение из носа прекращается, температура тела приходит к норме. Полости абсцесса заполняются грануляционной тканью и заживают, однако затвердение тканей межчелюстного пространства остается и после полного выздоровления.

У жеребят с пониженной резистентностью стрептококки могут проникать в заглочные, околоушные и шейные лимфоузлы и вызывать их гнойное воспаление. Гематогенным путем возбудитель может проникнуть в различные органы, и впоследствии развивается метастатическая форма мыта, часто заканчивающаяся летальным исходом.

Лабораторная диагностика. Патологический материал (истечения из носовых отверстий, гнойный экссудат или пунктат подчелюстных лимфоузлов), направленный в лабораторию, исследуют по общей схеме: микроскопия мазков; посев поступившего материала на питательные среды для выделения чистой культуры стрептококков и их идентификации; биологическая проба — на белых мышах, кошках. Особенно восприимчивы котята, которые гибнут от одной десятиллионной дозы бульонной культуры при подкожном заражении в течение 3–10 сут.

Дифференциация. Мытный стрептококк, в отличие от гноеродного стрептококка, не ферментирует молоко, лактозу, сорбит, маннит (табл. 3).

Иммунитет и биопрепараты. Животные, переболевшие мытом, приобретают стойкий иммунитет (чаще всего пожизненный). Вакцины из убитых культур стрептококков не вызывают иммунитет. Не получила применения и противомытная

Таблица 3

Дифференциация стрептококков

Вид	серологическая группа	тип гемолиза	Ферментация			рост в мытном антивирусе
			лактоза	сорбит	маннит	
<i>Str. equi</i>	C	β	–	–	–	Не растет
<i>Str. pyogenes</i>	C	β	+	+	+	Растет

Примечание: «–» — не ферментирует, «+» — ферментирует.

гипериммунная сыворотка ввиду ее дороговизны. Из средств общей терапии рекомендуют антибиотики в комбинации с сульфаниламидами, мытный вирус.

Мастит у крупного рогатого скота вызывают различные микроорганизмы, но наиболее частым возбудителем является *Streptococcus agalactiae*.

Морфология. *Str. agalactiae* — мелкие, диаметром 0,5–1 мкм, чуть сплюснутые или овальные кокки, располагающиеся длинными цепочками (несколькими десятками кокков). В мазках из культур, выросших на плотных питательных средах, маститный стрептококк образует короткие цепочки. Хорошо окрашивается всеми анилиновыми красителями, грамположителен, спор и капсул не образует.

Культивирование. Маститный стрептококк — аэроб. На обычных питательных средах растет слабо. Хорошо культивируется на средах с добавлением дефибринированной крови или кровяной сыворотки. В сывороточном МПБ растет в виде мелкозернистого осадка, при этом среда остается прозрачной. На кровяном МПА образует мелкие (точечные) блестящие сероватые колонии, окруженные зоной гемолиза (гемолиз типа β).

Чистую культуру стрептококка получают путем посева патологического секрета из пораженной доли вымени на кровяном МПА в бактериологических чашках. После инкубирования при 37°C в течение суток пересевают типичные для данного микроба колонии на сывороточный МПБ и кровяной агар.

Биохимические свойства. Маститный стрептококк не разжижает мясопептонный желатин и свернутую сыворотку, не обесцвечивает метиленовое молоко, лакмусовое молоко изменяет частично. Ферментирует с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, салицин. Не ферментирует сорбит и дульцит.

Для выяснения потенциальной гемолитической активности маститного стрептококка используют метод САМР (КАМП), получивший свое название по первым буквам фамилий австралийских исследователей: Кристи, Аткинс и Мунх-Петерсон. Метод основан на усилении гемолитической активности стрептококка группы В в зоне, близкой к полосе гемолиза стафило-

кокка на кровяном агаре; гемолитические, но утратившие или снизившие гемолитическую активность штаммы агалактийного стрептококка образуют заметную зону гемолиза вблизи стафилококка.

Токсинообразование. Маститный стрептококк продуцирует токсины — эритротоксин, гемолизин, некротоксин, лейкоцидин и ферменты — фибринолизин и гиалуронидазу.

Антигенная структура. *Str. agalactiae* принадлежит к серогруппе В.

Устойчивость. В высушенном гнойном экссудате сохраняется 2–3 мес. При нагревании до 85°C погибает в течение 30 мин. Замораживание консервирует его. Чувствителен к окситетрациклину, полимиксину в сочетании с сульфадимезином. Раствор гидроксида натрия (3% -й), раствор формалина (1% -й) обезвреживают маститный стрептококк через 10–15 мин.

Патогенность. Наибольшей вирулентностью обладают стрептококки, выделенные у коров, больных острым маститом: гнойный экссудат из вымени в дозе 0,1–0,2 мл убивает мышей при внутрибрюшинном заражении в течение суток.

Лабораторная диагностика и дифференциация. Материалом для исследования служит молоко маститных коров, которое засевают на МПА и кровяной агар.

Полученную культуру идентифицируют с учетом морфологических, культуральных, гемолитических свойств и по антигенной структуре, которую устанавливают в реакции диффузной преципитации в агаровом геле или методом флюоресцирующих антител со специфическими сыворотками.

Иммунитет. Обусловлен антитоксическими и антибактериальными факторами.

Биопрепараты. Отсутствуют. Для лечения используют антибиотики и сульфаниламиды, которые вводят через канал соска в молочную цистерну.

Гноеродный стрептококк *Str. pyogenes* вызывает у животных абсцессы, артриты, флегмоны, эндометриты, а также септицемию. Возникновению гнойных процессов способствуют пониженная сопротивляемость организма, несвоевременная хирургическая обработка ран, несоблюдение правил асептики и антисептики, травмирование тканей при исследовании ран, гиповитаминозы и авитаминозы.

Морфология. В мазках *Str. pyogenes* представляет собой короткие цепочки, состоящие из 3–5 клеток. Хорошо окрашивается растворами обычных анилиновых красителей. Грамположительен. Спор и капсул не образует.

Культивирование. Хорошо растет на средах с глюкозой или сывороткой крови. На МПА образует мелкие круглые колонии, на кровяном агаре вокруг колоний незначительная зона β -гемолиза; в МПБ — слабое помутнение.

Биохимические свойства. Свертывает молоко, вызывает редукцию лакмусового молока, обесцвечивает метиленовое молоко. Ферментирует лактозу, сорбит, маннит.

Лабораторная диагностика. Микроскопия мазков из бактериологического материала — гнойный экссудат ран, абсцессов, асептически взятый экссудат, кровь — при подозрении на септицемию. Для выделения чистой культуры *Str. pyogenes* проводят посев на питательные среды.

Биопрепараты. Методы активной иммунизации не разработаны. Лечение проводят антибиотиками, чаще в комбинации с сульфаниламидами, нитрофуранами, с использованием стрептококкового бактериофага и др.

Возбудитель диплококковой инфекции *Str. pneumoniae* был обнаружен в 1871 г. Л. Пастером в слюне ребенка, погибшего от бешенства. В чистой культуре пневмококки выделили в 1886 г. Френкель и Вексельбаум, которые установили роль пневмококка в этиологии крупозной пневмонии.

Пневмококки широко распространены в природе. У здоровых животных обнаруживают на слизистых оболочках дыхательных путей, пищеварительного тракта, половых органов; у коров, овец, свиней, коз, лошадей — вследствие нарушения зоотехнических норм содержания и неполноценного кормления в период беременности. После родов скрытое носительство пневмококков переходит в клинически выраженное заболевание — развиваются маститы и эндометриты.

Телята, ягнята, поросята, заразившиеся от матерей, становятся источником возбудителя инфекции для остального молодняка, что приводит к развитию энзоотии. Заражение происходит через желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Болезнь характеризуется септицемией, поражением легких (лобулярная пневмония) и желудочно-кишечного тракта.

Морфология. В мазках из патологического материала стрептококки имеют овальную форму и располагаются попарно или короткими цепочками. При хронических процессах клетки приобретают форму диплострептококка — слегка вытянуты в длину. Размеры — 0,8–1,25 мкм. В мазках из молодых культур преобладает диплококковая форма. Неподвижны. Спор не образуют.

В организме пневмококки образуют хорошо выраженную капсулу, которая утрачивается при культивировании на искусственных питательных средах, но сохраняется на средах с сыроваткой или кровью.

Культивирование. Пневмококки размножаются в аэробных и анаэробных условиях при 36–38°C и pH 7,2–7,6. Для их выращивания применяют среды, содержащие 0,5% глюкозы и 5% крови животных. На МПА образуют мелкие прозрачные колонии с голубым оттенком; в МПБ — помутнение; на сыроваточном агаре — мелкие прозрачные колонии, напоминающие капельки росы. На кровяном агаре колонии свежeweделенных культур диплококка мелкие, круглые, прозрачные, окружены зоной α -гемолиза (зеленая зона), в полужидком агаре наблюдают хлопьевидный рост, в желатине — рост по уколу без разжижения.

Биохимические свойства. Ферментируют с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит; не ферментируют арабинозу и дульцит; не образуют пигмента и индола.

Токсинообразование. На полужидком агаре с кровью и мальтозой продуцируют токсин, вызывающий смертельное отравление котят при пероральном введении.

Антигенная структура. Видовую специфичность определяет нуклеопротеиновый антиген, который расположен в глубине цитоплазмы пневмококков. Ближе к поверхности клетки находится видоспецифический соматический полисахаридный С-антиген. На поверхности цитоплазмы содержится типоспецифический протеиновый М-антиген. Вид *Str. pneumoniae* имеет 84 серовара, агглютинирующихся только соответствующими типовыми сыворотками. Антигенная структура пневмококков под влиянием различных физических и химических факторов может быстро изменяться, что сопровождается формированием на агаре переходных, а затем шероховатых колоний,

потерей капсулы, вирулентности, гемолитических и иммуногенных свойств, а также повышением биохимической активности.

Устойчивость. Диплококк малоустойчив. Нагревание при 55°C вызывает гибель культуры через 10 мин. Во внешней среде погибает в течение 3–4 нед. В качестве дезинфектантов используют формалин, гидроксид натрия, хлорную известь. Пневмококки легко подвергаются аутолизу вследствие высокой активности их внутриклеточных ферментов.

Патогенность. Наиболее чувствительны к пневмококкам белые мыши и кролики. Подкожное введение небольших доз культуры вызывает гибель мышей от септицемии в течение 12–36 ч. При заражении слабовирулентными культурами развиваются длительно протекающие хронические заболевания. Восприимчивы также крупный и мелкий рогатый скот, собаки, крысы и другие виды животных.

Диплококк патогенен для мышей, кроликов, поросят, ягнят, телят, а при введении в сосок молочной железы — для овец, свиней, коров.

Наиболее вирулентны свежие культуры пневмококка, выделенные из трупов молодняка, павшего от диплококковой инфекции (при токсикосептической форме). Токсины специфичны, т. е. нейтрализуются только противодиплококковой сывороткой.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют свежие трупы молодняка или паренхиматозные органы, трубчатые кости, сердце с кровью, кровь в запаянных пипетках, головной мозг. При подозрении на диплококковый эндометрит или мастит у взрослых животных исследуют выделения из половых органов и молоко.

Диагноз ставят на основании микроскопии мазков, выделения чистой культуры и результатов биопроб.

Биопробу ставят на белых мышах, которые после внутрибрюшинного или подкожного заражения гибнут через 16–48 ч.

Серологический метод. Стрептококковые антигены в крови выявляют в РСК с иммунными кроличьими сыворотками (по В. И. Иоффе).

Для типизации диплококков используют РА и метод иммунофлюоресценции, который позволяет выявить стрептококки в смешанной популяции микробов, если эту популяцию обработать флюоресцирующей антисывороткой к стрептококкам.

Иммунитет. Сопровождается скрытым носительством диплококков в организме животных.

Биопрепараты. Для специфической профилактики диплококковой инфекции используют полужидкую формолвакцину из вирулентных штаммов; ассоциированную вакцину против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят; инактивированные вакцины из стрептококков серологической группы С.

Для лечения используют сыворотку против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят, полученную гипериммунизацией волов.

Применяют пенициллин, биомицин, тетрациклин, окситетрациклин, полимиксин М, которые являются эффективными средствами против диплококков как при острых септических случаях, так и при подострых, хронических и осложненных пневмонией.

14.2. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ПАЛОЧКИ, НЕ ОБРАЗУЮЩИЕ СПОРЫ

14.2.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ РОЖИ СВИНЕЙ

Возбудитель рожи свиней — бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*, представитель отдела *Firmicutes* и рода *Erysipelothrix*. Вызывает инфекционную болезнь, характеризующуюся при остром течении септицемией и воспалительной эритемой кожи, хронически — эндокардитом и артритом. Болеют животные преимущественно в возрасте 3–12 мес.

Бактерию открыли Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г.

Морфология. Возбудитель — тонкая прямая или слегка изогнутая мелкая палочка размером 0,2–0,3×1,5–2 мкм (рис. 20).

В старых бульонных культурах и в наложениях на сердечных клапанах

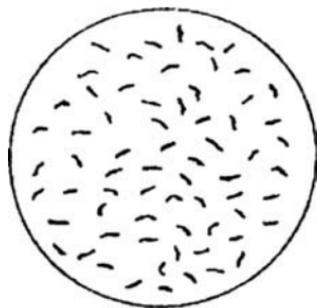


Рис.20
Возбудитель рожи свиней

при веррукозном эндокардите обнаруживают удлинённые и нитевидные формы. Бактерии неподвижны. Спор и капсул не образуют. Грамположительные, хорошо окрашиваются обычными анилиновыми красителями.

Культивирование. Растет в аэробных и анаэробных условиях, лучше в атмосфере с пониженным давлением кислорода, содержащей 5–10% CO₂ (микроаэрофил). Культивируется в МПБ, на МПА, МПЖ, ПЖА (0,15–0,2% агара), бульоне Хоттингера, элективной среде Сент-Иваньи (агаровая среда с 0,1% кристалл виолета и 1% азид натрия). Оптимальные условия для роста: температура 36–37°C, pH 7,2–7,6. В МПБ вызывает слабое помутнение без образования пристеночного кольца и пленки, при встряхивании пробирки хорошо заметны муаровые волны: через 48–72 ч среда несколько просветляется, на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании поднимается в виде облачка.

На МПА возбудитель растет в виде мелких росинчатых просвечивающихся колоний (S-форма), с трудом различимых невооруженным глазом: S-формы выделяют при септицемии. При хроническом течении болезни могут вырастать колонии R-формы, крупные, с неровной шероховатой поверхностью и отходящими от края корнеобразными отростками.

В столбике желатина при посеве уколом через 6–10 сут от серовато-белого стержня отходят горизонтальные нежные отростки, напоминающие по форме щетку; желатин не разжижается.

Биохимические свойства. Бактерии рожи свиней выделяют сероводород, не образуют индол и каталазу; большинство штаммов разлагают с образованием кислоты без газа лактозу, глюкозу, галактозу, левулезу, редко — ксилозу, арабинозу, мальтозу и рамнозу, не ферментируют сахарозу, маннит и салицин.

Антигенная структура. По содержанию антигенов бактерии рожи свиней могут быть разделены на три группы: А, В и N. Антиген N — общий видовой. Серовары А и В отличаются своими гаптенами. Штаммы серовара В несут гемагглютинирующий и растворимый иммуногенный антиген, поэтому они особенно пригодны для активной иммунизации.

От больных свиней, а также здоровых бактерионосителей выделяют преимущественно штаммы серовара А (до 95%), реже серовара В и очень редко — N.

Устойчивость. Возбудитель обладает высокой устойчивостью во внешней среде. В трупах животных может сохраняться, а иногда и размножаться в течение 3–4 мес. В почвах, богатых органическими веществами, сохраняется 7–8 мес., в навозной жиже — до 20 сут, в водопроводной воде — 108, в речной воде при 4°C — 75–86, в моче свиней — 113–145, в фекалиях — 38–75 сут. В засоленной свинине бактерии выживают до 6 мес., в копченых продуктах — до 3 мес. Прямые солнечные лучи убивают через 10–12 сут, высушивание при рассеянном свете — через 3–4 нед.; нагревание при 50°C — через 15 мин, при 70°C — через 5 мин.

Бактерия не устойчива к антибиотикам и дезинфектантам. Особенно эффективны 2–3%-е растворы гидроксида натрия, 20%-я взвесь свежегашеной извести, 2%-й раствор формальдегида, 5%-й горячий раствор кальцинированной соды.

Патогенность. Восприимчивы к бактериям свиньи, особенно в возрасте от 3 мес до 1 года. Спорадические случаи болезни отмечены у лошадей, крупного рогатого скота, овец, оленей, собак. Восприимчивы дельфины, многие виды грызунов и насекомыхоядных, утки и гуси, а также куры и индейки. Бактерии рожи патогенны и для человека. Обнаружены на поверхности тела, в кишечнике и даже мышцах некоторых видов морских и пресноводных рыб, для которых они непатогенны.

К экспериментальному заражению восприимчивы белые мыши и голуби, они гибнут через 2–5 сут. Менее чувствительны кролики, которые после внутривенного заражения гибнут на 3–6-е сутки.

Патогенез. Заражение свиней и других видов животных, в том числе птиц, происходит при проникновении возбудителя алиментарно, через поврежденную кожу или при укусах кровососущих насекомых. Попадающие в организм бактерии не сразу проникают в кровь и внутренние органы, часто оседают в миндалинах и солитарных фолликулах кишечника. Размножаясь в месте первичной локализации, выделяют токсические вещества, обуславливающие сенсibilизацию организма. При неблагоприятном течении болезни наблюдается диссеминация возбудителя лимфогенным и гематогенным путями, развивается сепсис, накапливаются токсические продукты бактерий, происходят дистрофические и некробиотические изменения в тканях,

подавляется фагоцитоз, наступают тяжелые функциональные расстройства сердечно-сосудистой системы и гибель животных.

При подостром и хроническом течении болезни происходит локализация возбудителя и обезвреживание его токсических продуктов, активизируется синтез специфических иммуноглобулинов и фагоцитоз, преобладают аллергические реакции, проявляющиеся в виде кожной экзантемы, веррукозного эндокардита и серозно-фибринозных артритов. Возможна персистенция возбудителя рожи свиней в организме других животных.

Лабораторная диагностика. Для исследования в лабораторию направляют групп животного целиком или сердце, печень, селезенку, почку и трубчатую кость. При подозрении на хроническое течение — обязательно сердце.

Выявление возбудителя рожи проводят с использованием микроскопического, бактериологического и серологического (РА, РИФ) методов.

Мазки-отпечатки из органов окрашивают по Граму. В положительных случаях в мазках обнаруживают грамположительные палочки, расположенные одиночно, попарно или скоплениями, при хроническом течении — длинные переплетающиеся нити.

Высевы делают из крови сердца с пораженными клапанами, почки, селезенки, печени, костного мозга в МПБ или бульон Хоттингера и на МПА. Посевы инкубируют при 36–37°C в течение 18–24 ч, а при отсутствии роста — еще сутки. Выделенную культуру идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, а также в реакции агглютинации с позитивной сывороткой.

Биохимическую активность определяют на средах Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой и маннитом. Одновременно определяют образование сероводорода и каталазы.

РА ставят с гипериммунной лечебной сывороткой. На предметное стекло наносят каплю сыворотки в разведении 1:50, затем петлей вносят суточную агаровую культуру и тщательно растирают ее. В положительном случае агглютинация наступает быстро, агглютинат имеет вид плотных мелких комочков.

Культуру, выделяющую сероводород, не образующую каталазу, разлагающую глюкозу, лактозу (без газа) и не фермен-

тирующую сахарозу и маннит, дающую положительную РА, относят к возбудителю рожи.

Для обнаружения рожистых бактерий в патологическом материале, а также идентификации выделенных культур используют метод флюоресцирующих антител.

Биологическая проба. Белых мышей или голубей заражают суспензией (1:10) из органов или бульонной культурой; мышей заражают подкожно (0,1–0,2 мл), голубей — внутримышечно (0,2–0,3 мл). Мыши и голуби погибают через 2–4 сут. Из органов павших делают посев в МПБ и на МПА для выделения чистой культуры возбудителя.

Дифференциальный диагноз. Бактерию рожи свиней необходимо дифференцировать от возбудителя мышинной септицемии (*Bact. murisepticum*), который непатогенен для голубей, ферментирует сахарозу, не дает РА со специфической рожистой сывороткой, а также от возбудителя листериоза.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие свиньи приобретают стойкий и длительный иммунитет. Поствакцинальный активный иммунитет продолжается в среднем 4–6 мес., пассивный — до 2 нед.

Л. Пастер (1883) первый применил профилактические прививки свиней против рожи аттенуированными культурами. В России живые вакцины против рожи свиней получили П. И. Боровский (1897) и Д. Ф. Конев (1904). У нас в стране применяют концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против рожи свиней и вакцину против рожи свиней из штамма ВР-2.

Для пассивной профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Положительный эффект при лечении оказывают антибиотики (пенициллин, стрептомицин, окситетрациклин, эритромицин и др.), особенно в сочетании с гипериммунной сывороткой.

14.2.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА

Возбудитель листериоза был выделен в 1892 г. Дж. Листером от больных кроликов. В 1927 г. Д. Х. Пири выделил возбудителя при септическом заболевании крысopodobных грызунов с типичным поражением печени и назвал его «листерелла», но

в 1940 г. он переименовал его в «листерия». По современной классификации листерии внесены в 14-ю секцию (неспоробразующие грамположительные палочки) отдельным родом *Listeria*, в котором насчитывается пять видов. Основной вид — *Listeria monocytogenes* — вызывает болезнь у животных многих видов и человека. Характеризуется септическими явлениями, поражением центральной нервной системы и генитального аппарата.

Морфология. *L. monocytogenes* — полиморфная палочка с закругленными концами, длиной 0,5–3 мкм и шириной 0,3–0,5 мкм; подвижная, грамположительная. В мазках палочки располагаются поодиночке или под углом в виде римской цифры V. Спор и капсул не образуют (рис. 21).

Культивирование. Листерии — факультативные аэробы. Оптимум температурного роста на питательных средах с pH 7,2–7,4 составляет 36–38°C, однако они могут расти при температуре от 4 до 45°C. На МПА образуют мелкие, круглые, выпуклые, прозрачные колонии диаметром от 0,2–0,4 до 2 мм. В МПБ вызывают помутнение среды с образованием слизистого осадка. Листерии хорошо растут на печеночных средах с добавлением 1% глюкозы и 2–3% глицерина. В качестве элективных сред используют МПБ с 0,05% теллурита калия или 0,01–0,02% теллурита калия в водном растворе глицерина и растворе флоримицина или полимиксина. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона гемолиза.

Биохимические свойства. Листерии ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, рамнозу и салицин, замедленно сахарозу, крахмал и глицерин; некоторые культуры разлагают лактозу и мальтозу. Не ферментируют арабинозу, дульцит, инулин и сорбит, не образуют индола и сероводорода, не разжижают желатин, не восстанавливают нитраты в нитриты, дают положительную пробу на каталазу.

Антигенная структура. Листерии имеют два антигена: соматический (O) и жгутиковый (H). Различа-

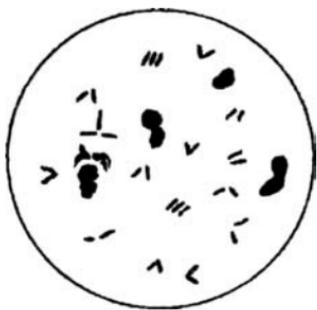


Рис. 21
Листерии

ют две серологические группы, объединяющие различные в антигенном отношении листерии. Установлено 16 основных серологических групп, многие из которых подразделены на подгруппы. Наиболее часто выделяют 1-й и 4-й серотипы листерий.

Устойчивость. Листерии устойчивы во внешней среде. В почвах они сохраняют жизнеспособность от 6 до 11 мес. и размножаются в почвенных экстрактах; в воде — в течение года и более, в навозе — до 7 мес., в силосе — более года, в мясе — до года. В бульонных культурах листерии погибают при 100°C через 10–15 мин, при 55°C — через 1 ч; 2,5%-й раствор формальдегида обезвреживает их через 20 мин, 2,5%-й раствор гидроксида натрия, раствор хлорной извести с содержанием 2%-го активного хлора — через 20 мин.

Патогенность. Листерии патогенны для многих видов млекопитающих, в том числе грызунов, хищных и копытных, а также для птиц. Из домашних животных листериоз зарегистрирован у овец, коз, свиней, крупного рогатого скота, лошадей, кроликов, кур, уток и др.

Биологическая проба. Наиболее чувствительны белые мыши и кролики. Заражают внутрибрюшинно или внутривенно в дозе 0,3–0,5 мл суточной бульонной культуры.

Патогенез. В зависимости от места внедрения возбудитель распространяется в организме различными путями: гематогенным, лимфогенным и нейrogenным. Различают септическую и нервную формы болезни. При септической форме, которую чаще наблюдают у молодняка, листерии заселяют все органы и ткани организма, вызывая дегенеративные изменения в паренхиматозных органах. Нервная форма проявляется менингоэнцефалитом, при этом листерии обнаруживают только в головном и спинном мозге. У беременных животных листерии вызывают гибель плодов и аборт. Патогенное действие листерий обуславливается выделением экзо- и эндотоксинов.

Диагностика. Бактериологическая: диагноз ставят на основании выделения культуры листерий из патологического материала. Для исследования в лабораторию направляют трупы мелких животных или голову (головной мозг), паренхиматозные органы, абортированный плод и его оболочку. Для прижизненной диагностики направляют кровь или сыворотку крови с целью серологического исследования, а также истечения

из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени.

Вначале проводят микроскопическое исследование тонких мазков-отпечатков из патологического материала, которые окрашивают по Граму, а также с использованием флюоресцирующих антител.

Из органов и головного мозга делают обильные посевы на питательные среды, а также на кровяной агар и селективные среды. Рекомендуются часть материала сохранять в холодильнике в течение 30 сут для проведения повторных исследований при отрицательном результате первичного посева.

Посевы инкубируют в термостате при 37°C, ежедневно просматривая в первые 3–4 сут; при отсутствии роста наблюдение продолжают до 2 нед.

Выделенные культуры исследуют на подвижность, изучают их ферментативные свойства на средах Гисса, ставят пробу на каталазу. Проводят дифференциацию от возбудителя рожи свиней, делая высев на среду с метилротом или нейтральротом в смеси с метиленовым синим) листерии обесцвечивают среды, возбудитель рожи свиней — нет. Ставят капельную РА на стекле с поливалентной листериозной агглютинирующей сывороткой. Затем с помощью серогрупповых сывороток определяют серогруппу выделенной культуры.

Специфические свойства листерий проверяют также с помощью конъюнктивальной пробы на морских свинках или внутрикожной пробы на морских свинках или кроликах.

Конъюнктивальная проба: на конъюнктиву глаза морской свинки наносят 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном. На 2–4-е сутки вирулентные листерии вызывают гнойный кератоконъюнктивит. При внутрикожной пробе через 48 ч развивается воспаление с последующим некрозом участка кожи и образованием струпа (табл. 4).

Для типирования культур используют также листериозные бактериофаги, включающие два монофага L2A и L4A.

Серологическая: сыворотку животных исследуют в РА и РСК. Для РА применяют два антигена (1-й и 2-й серогрупп), представляющие собой взвесь листерий, инактивированных кипячением. РА признается положительной при наличии агг-

**Дифференциальные признаки
возбудителей листериоза и рожи свиней**

Показатель	Листерии	Бактерии рожи
Подвижность	Подвижны	Неподвижны
Проба на каталазу	Положительная	Отрицательная
Салицин	Разлагает	Не разлагает
Индикаторные среды	Обесцвечивает	Не обесцвечивает
РА с позитивной листериозной сывороткой	Положительная	Отрицательная
Конъюнктивная проба на морских свинках	Положительная	Отрицательная

лютинации с оценкой не менее чем на два креста в разведениях сыворотки 1:200 для овец, коз и свиней, для лошадей и крупного рогатого скота — 1:400, для кроликов — 1:50.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают иммунитет. С профилактической целью применяют сухую живую вакцину из штамма АУФ. После однократного ее введения у крупного рогатого скота, свиней и овец создается иммунитет продолжительностью до 1 года, у кроликов и норок — до 6 мес.

Листерии чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда (окситетрациклин, хлортетрациклин), ампициллину.

14.3. ПАТОГЕННЫЕ МИКОБАКТЕРИИ

14.3.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА

Род *Mycobacterium* (лат. *mycos* — гриб, *bacterium* — палочка) включает 49 видов как патогенных, так и непатогенных микроорганизмов. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), животных (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*), мышей (*Myc. murium*), а также у холоднокровных — рыб, змей, лягушек, черепах (*Myc. poikilotermum*); возбудителей проказы (*Myc. leprae*) и паратуберкулеза крупного рогатого скота (*Myc. paratuberculosis*).

Патогенные микобактерии вызывают туберкулез — инфекционную, хронически протекающую болезнь у человека, животных, птиц, особенно кур. Патологоанатомически он характеризуется образованием множественных туберкулов (бугорков), подвергаемых творожистому перерождению, обызвествлению. Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г. Птичий вид установили Штраус и Гамалея (1891).

Наряду с истинными возбудителями туберкулеза животных, человека, в объектах окружающей среды присутствуют так называемые атипичные микобактерии, отличающиеся по своим свойствам от туберкулезных и друг от друга.

Чем продиктован интерес к атипичным микобактериям? Во-первых, их обнаруживают не только у людей и животных, больных туберкулезом, но и в условно благополучных стадах среди животных, у которых они вызывают сенсбилизацию к туберкулинам. Во-вторых, отдельные атипичные микобактерии могут вызывать ряд хронических заболеваний, напоминающих туберкулез, которым присвоено название «микобактериозы». В-третьих, их очень сложно дифференцировать от истинных микобактерий туберкулеза.

Атипичные микобактерии широко распространены в природе, что обуславливает их попадание в организм животных через корм, подстилку и другие объекты окружающей среды. В результате при лабораторной диагностике патологического материала, молока, кормов, воды, почвы, объектов среды обитания животных резко возросло число выделений атипичных микобактерий, что требует тщательной их идентификации, однако строгая классификация атипичных микобактерий до сих пор отсутствует. Наибольшее распространение получила классификация Е. Раньона (1959), основанная на двух свойствах атипичных микобактерий: образовании пигмента и скорости роста. По Раньону различают четыре группы:

- 1) фотохромогенные микобактерии, приобретающие темно-оранжевую окраску при выращивании на свету. В полной темноте они не образуют пигмента, основной представитель — *Myc. kansasii*;

- 2) фотохромогенные микобактерии, приобретающие ярко-оранжевую окраску независимо от выращивания на свету или в

темноте, основные представители — *Myc. scrofulaceum*, *Myc. gordonae*, *Myc. aquae* и др.;

3) нефотохромогенные микобактерии, могут быть неокрашенными или иметь желтовато-оранжевые оттенки, однако пигментация не зависит от экспозиции на свету, основные представители — *Myc. intracellulare*, *Myc. battey*;

4) быстрорастущие микобактерии — образуют колонии в течение недели при 25 и 37°C, представители — *Myc. phlei*, *Myc. smegmatis*, *Myc. fortuitum*.

Морфология. Микобактерии туберкулеза — кислото-, спирто- и щелочеустойчивые микроорганизмы. Неподвижны, спор и капсул не образуют, жгутиков не имеют. Типичная форма — прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными краями. В электронном микроскопе микобактерии всех видов имеют вид палочки с закругленными краями (рис. 22, 23), однако нередко встречаются изогнутые и овальные формы.

Размеры клеток могут значительно варьировать в зависимости от возраста культуры: длина от 1,5 до 4 мкм, ширина от 0,2 до 0,5 мкм. Установлена филогенетическая близость микобактерий туберкулеза с лучистыми грибами-актиномицетами: медленное развитие микобактерий на селективных питательных средах, способ размножения, полиморфность и способность при определенных условиях иногда образовывать нитевидные ветвистые формы с колбовидными вздутиями на концах.

Это послужило причиной замены названия бациллы Коха на микобактерию туберкулеза (*Myc. tuberculosis*).

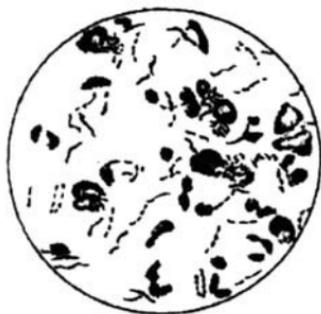


Рис. 22
Mycobacterium tuberculosis



Рис. 23.
Mycobacterium bovis

Микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов (от 30,6 до 38,9%), вследствие этого трудно окрашиваются анилиновыми красителями, но хорошо воспринимают краску после обработки карболовым фуксином при подогревании. При таком методе микобактерии туберкулеза хорошо удерживают красители и не обесцвечиваются при воздействии разведенных кислот, щелочей и спирта, чем отличаются от других микробов. На этом основан метод окраски микобактерий по Цилю — Нильсену. Микобактерии с трудом окрашиваются положительно по Граму и приобретают сине-фиолетовый цвет.

Для быстрого обнаружения микобактерий в различных объектах существует люминесцентный метод, в основе которого лежит их способность окрашиваться люминесцентными красителями (родамин-аурамином) и давать золотисто-желтый цвет под воздействием ультрафиолетового излучения. Метод обладает высокой чувствительностью, дает цветное изображение возбудителя. Исследование ведется при среднем увеличении, что дает возможность просмотреть большее поле, чем при иммерсионной микроскопии под большим увеличением.

Благодаря электронной микроскопии у микобактерий выявлены трехслойная клеточная стенка, микрокапсула, цитоплазматическая мембрана и др. В состав цитоплазматической мембраны входят липопротеидные комплексы, различные ферментные системы, в частности, ответственные за окислительно-восстановительные процессы. Цитоплазма микобактерий представлена гранулами, вакуолями и полостями, число которых может возрасти после воздействия химических агентов.

В микрокультурах, развивающихся в жидких питательных средах, микобактерии человеческого и бычьего видов образуют косы, жгуты, завитки, скопления. Микрокультуры легко обнаруживают при обычной микроскопии мазков, окрашенных по методу Циля — Нильсена. В препаратах, приготовленных из первичных посевов, при исследовании под фазовым контрастом обычно различают гомогенные зернистые элементы, среди которых встречаются сферические светопреломляющие структуры.

В культурах, выделенных от крупного рогатого скота, чаще находят шаровидные образования правильной формы, одинаковых размеров, а также отдельно лежащие нитевидные структуры.

Культивирование. Микобактерии туберкулеза размножаются в строго аэробных условиях на специальных селективных питательных средах, содержащих соединения углерода, азота, водорода и кислорода, а также магний, калий, серу и фосфор. Стимулирующее влияние на рост туберкулезных микобактерий оказывают соли железа и некоторые другие элементы. Необходимым условием для осуществления биохимических процессов у микобактерий является создание оптимальной температуры: 37–38°C для человеческого, 38–39°C для бычьего и 39–41°C для птичьего вида. Следует отметить, что микобактериям туберкулеза присущ медленный обмен веществ: рост культур проявляется через 15–30 сут и более, в начале в виде почти незаметных микроколоний, из которых затем формируются визуально наблюдаемые макроколонии. В 1887 г. Нокар и Ру обнаружили у микобактерий туберкулеза глицеринофильность. Глицерин оказался лучшим источником углерода: прибавление его в мясной бульон и агар вызывает обильный рост культур.

При выборе среды следует учитывать ее назначение: для пересева и сохранения субкультур лучше использовать простые глицеринсодержащие среды (МПГБ, глицериновый картофель). Для первичного выделения культур оправдали себя только плотные яичные среды Петраньяни, Гельберга и др. Для изучения биохимических свойств микобактерий и других целей целесообразно применять безбелковые синтетические среды Сотона, Моделя.

Возбудители туберкулеза, особенно птичьего вида, ряд атипичных и сапрофитных микобактерий в жидких питательных средах показывают как поверхностный, так и придонный рост с наличием бугристой, морщинистой пленки крошкообразной консистенции, имеющей желтовато-коричневый, кремовый или бурый цвет.

На плотных средах микобактерии образуют сливающиеся бугристые колонии, которые могут иметь гладкую блестящую или шероховатую поверхность, а также сплошной морщинистый налет белого, или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета.

Существуют методы ускоренного выращивания (микрокulturивирование) микобактерий, предложенные рядом исследователей (Прайс, 1941; Е. А. Школьникова, 1948; Н. М. Кольчев, 1970 и др.).

Метод Прайса: мазок на стекле высушивают, затем выдерживают 5 мин в 5% -м стерильном водном растворе серной кислоты. Кислоту смывают стерильной дистиллированной водой. Мазок помещают в жидкую питательную среду, в которой рост микобактерий проявляется на стеклах через 2–6 сут в виде микрокультур, после их окраски по Цилю — Нильсену при микроскопии.

Биохимические свойства. Микобактерии туберкулеза содержат различные ферменты. Ферменты эстераза и липаза расщепляют жиры; дегидраза — органические кислоты, в том числе аминокислоты; уреазы — мочевины, перигалогаза — углеводы, каталаза — перексид водорода; протеолитические ферменты (протеаза) — белок. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углеводы, лецитин, фосфатиды. У молодых культур микобактерий туберкулеза сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

Токсикообразование. Микобактерии туберкулеза содержат эндотоксины — туберкулины (Р. Кох, 1890), которые проявляют токсическое действие только в больном организме. Жирные кислоты (масляная, пальмитиновая, туберкулостеариновая, олеиновая) способствуют распаду клеточных элементов, творожистому перерождению тканей, блокируют липазу и протеазы, вырабатываемые микобактериями. Вирулентные микобактерии содержат полисахаридные компоненты, корд-фактор, повышающий их вирулентность, кроме того, корд-фактор разрушает митохондрии клеток зараженного микроорганизма, нарушая процессы дыхания и фосфорилирования.

Антигенная структура. Микобактерии туберкулеза содержат полисахаридо-белково-липоидный комплекс, названный полным антигеном. При парентеральном введении у животных наблюдают образование антител, которые выявляют в серологических реакциях — РА, РП, РСК и др.

Туберкулины также относятся к антигенам. В отдельности ни одна из фракций микобактерий туберкулеза (туберкулопротеиды, туберкулолипиды, туберкулополисахариды) не вызывает иммунологических сдвигов в организме. Образование антител вызывает лишь полисахаридо-липоидный комплекс, то есть полный антиген.

Среди атипичных микобактерий различают общие и групповые антигены. Для их идентификации используют серологические тесты, чаще метод диффузионной преципитации в агаре по Оухтерлони.

Устойчивость. Микобактерии туберкулеза отличаются устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли микобактерии сохраняют жизнеспособность от 2 до 7 мес. и более; в проточной воде — более года, в почве — до 3 лет. Низкие температуры не влияют на жизнеспособность микобактерий.

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

Важное значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде они погибают при 60°C в течение 1 ч, при 65°C — через 15 мин, при 70–80°C — через 5–10 мин.

В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9–10 сут, а в скисшем гибнет под воздействием молочной кислоты; в масле — недели, а в некоторых сырах — даже месяцы.

Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими непоробразующими бактериями значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим веществам; 5% -й раствор фенола и 10% -й раствор лизола разрушают возбудителя через 24 ч, 4% -й формалин — после 3 ч.

В качестве дезинфицирующих растворов при туберкулезе наиболее эффективны: 3% -й щелочной раствор формальдегида при 3-часовой экспозиции; 2% -й (по формальдегиду) раствор метафора, растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция и взвеси, содержащие не менее 5% активного хлора при экспозиции 3 ч; 1% -й раствор глутарового альдегида, 8% -я эмульсия феносмолина из расчета 1 л/м² и при экспозиции 3 ч и др.

Патогенность. Бычий вид микобактерий вызывает болезнь у коров, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, оленей, маралов и др. Из лабораторных животных наиболее чувствительны кролики и морские свинки, у которых развивается генерализованный туберкулез.

Птичий вид микобактерий вызывает туберкулез у кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов, голубей, уток и др. В естественных условиях возможно заражение домашних животных (лошади, свиньи, козы, овцы, иногда крупный рогатый скот) и даже человека.

Из лабораторных животных наиболее подвержены кролики, морские свинки менее восприимчивы.

Инкубационный период длится от нескольких недель до нескольких лет. Доказана персистенция L-форм, которые обладают способностью к реверсии в типичные микобактерии. Наличие L-форм рассматривают как причину рецидива туберкулеза в оздоровленных стадах (В. С. Федосеев, А. Н. Байгазанов, 1987; Ч. М. Сафина, 2011).

Патогенез. Возбудитель туберкулеза, попав в организм аэрогенным, алиментарным и другими путями, проникает в межклеточные щели слизистой оболочки, где его поглощают подвижные полиморфноядерные лейкоциты (фагоциты) и с током лимфы или крови разносят по всему организму. Размножение микобактерий туберкулеза и взаимодействие с ними макрофагов происходит преимущественно в тканях с избирательной локализацией туберкулезного процесса (лимфатические узлы, легкие, печень и др.). В дальнейшем в местах жизнедеятельности возбудителя формируется защитный очаг — туберкул.

Туберкулезные изменения в тканях представляют собой воспалительную реакцию, включающую процессы альтерации (некроз части тканевых элементов), экссудации (выход из сосудов плазмы с форменными элементами) и пролиферации (формирование соединительной капсулы). Основу туберкула составляют фагоциты. Туберкул вначале имеет сероватый цвет и округлую форму; величина — от булавочной головки до чечевичного зерна. Затем узелок окружается соединительнотканной капсулой. Ткань внутри инкапсулированного узелка из-за отсутствия притока питательных веществ и под воздействием токсинов возбудителя отмирает и превращается в сухую крошковатую массу, напоминающую творог (казеоз).

Процесс формирования первичного туберкулезного очага получил название первичного комплекса. Исход данного процесса может быть различным. При высокой естественной резистентности организма и минимальных дозах возбудителя мо-

жет произойти заживление первичного туберкулезного очага с одновременным разрушением содержащихся в нем микобактерий. Но чаще всего инкапсулированные первичные очаги обызвествляются и вместе с находящимися внутри них туберкулезными микобактериями сохраняются в организме длительное время, даже в течение всей жизни.

В организме с пониженной резистентностью процесс инкапсуляции возбудителя в первичном очаге выражен слабо. Вследствие недостаточной регенерации соединительной ткани происходит расплавление стенок туберкулезного узелка, при этом микобактерии попадают в здоровую ткань, что приводит к образованию множества мелких узелков, которые могут сливаться между собой, образуя крупные туберкулезные фокусы.

Микобактерии из туберкулезных фокусов могут попасть в кровь, что приводит к генерализации процесса и развитию в разных органах туберкулезных очагов различной величины. При такой стадии болезни отмечается неблагоприятный исход туберкулезной инфекции — истощение и смерть.

Следует отметить, что в последние годы довольно часто наблюдается скрытое течение туберкулезной инфекции, при котором возбудитель длительное время пребывает в макроорганизме, но специфические туберкулезные изменения во внутренних органах и тканях отсутствуют.

Лабораторная диагностика. Выделить возбудителя туберкулеза в чистом виде трудно. Успех во многом зависит от исследуемого материала, в качестве которого можно использовать пораженные органы и ткани, кровь, экссудат, транссудат, гной, молоко, масло, творог, мочу, фекалии, навоз, почву, воду, соскобы с различных объектов животноводческих помещений и др. В каждом случае перед посевом применяют соответствующий метод обработки материала.

Для освобождения от посторонней микрофлоры исследуемый материал (молоко, мочу, слизь, пораженные органы и ткани) обрабатывают 6–10% -м раствором серной кислоты (метод Гона) не более 25–30 мин.

Для обработки жидкого, полужидкого, кашицеобразного материала и соскобов с объектов среды обитания животных используют метод флотации. Сущность метода заключается в том, что исследуемый материал взбалтывают в колбе вместе с

углеводородами (бензол, бензин и др.), а всплывающий слой пены — флотат, содержащий микобактерии туберкулеза, используют для приготовления мазков, посевов на питательные среды, заражения лабораторных животных.

Дифференциация микобактерий туберкулеза. Для дифференциации микобактерий существуют следующие методы: микроскопический, культуральный, цитохимический, биохимический, серологический, аллергический, биологический и др.

Микроскопический метод: размеры и форма всех туберкулезных микобактерий весьма относительно и при определенных условиях выращивания колеблются иногда в довольно широких пределах. Бычий вид — микобактерии достигают длины 1,5–3,5 и толщины 0,3–0,5 мкм; также встречаются в виде овоидных и кокковидных форм. Палочковидные формы чаще прямые и изогнутые, с округленными концами и зернистостью. Человеческий вид микобактерий — более длинные, тонкие. Микобактерии птичьего вида наблюдаются в виде коротких и длинных полиморфных палочковидных форм. Представители микобактерий мышинового вида тоже полиморфны.

Культуральный метод: вирулентные культуры микобактерий бычьего вида на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. Культуры микобактерий человеческого вида также растут в виде сферических колоний, которые встречаются как в R-, так и в S-форме. Свежевыделенные культуры микобактерий птичьего вида растут быстрее, чем человеческого и бычьего. Рост характеризуется образованием гладких, мелких, круглых, белых, блестящих, с ровными краями колоний, располагающихся как единично, так и в виде скоплений или сплошного слизистого налета.

Биологический метод — определение патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые отличаются восприимчивостью к различным микобактериям туберкулеза.

Дифференциацию выделенных культур проводят на двух кроликах массой не менее 1,5–2 кг, которым в краевую вену уха вводят суспензию культуры микобактерий в физиологическом растворе: первому — в дозе 0,1, второму — 0,01 мг бактериальной массы. Возбудитель туберкулеза бычьего вида на про-

тяжении 3 мес вызывает генерализованное поражение, человеческого вида — нетипичные туберкулезные очажки регрессивного характера, птичьего вида — септическую форму болезни без образования специфических патологических изменений в органах и тканях с летальным исходом в течение 2–3 нед.

Параллельное заражение двух морских свинок такими же дозами культуры позволяет дифференцировать возбудителя птичьего вида, к которому они нечувствительны, в то время как микобактерии человеческого и бычьего видов вызывают прогрессивные туберкулезные изменения. У кур, зараженных внутривенно бактериальной массой, микобактерии птичьего вида в дозе 1 мг вызывают туберкулезные поражения селезенки, печени и кишечника. Куры к возбудителю человеческого и бычьего видов менее чувствительны.

Биохимический метод основан на проявлении различной ферментативной активности микобактерий разных видов. Наиболее демонстративны следующие тесты биохимической дифференциации микобактерий: ниациновый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, деградация (разрушение) салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5%-му хлориду натрия и пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Серодиагностика. Для ранней диагностики туберкулеза, а также для определения антигенного родства между истинными и атипичными микобактериями используют реакцию связывания комплемента (РСК) с антигенами УНИИЭВ (Ю. Я. Касич) и СибНИВИ (Э. Д. Лакман); реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Аллергическая диагностика туберкулеза. Ведущее место в прижизненном распознавании туберкулеза у животных и птиц занимает аллергическая диагностика с использованием туберкулина (Р. Кох, 1890). Однако еще до Коха в России Гельман (1888–1889) изготовил экстракт из туберкулезных бактерий и испытал его с диагностической целью на больных туберкулезом коровах, получив положительный результат. Диагностика с помощью туберкулина наиболее распространена в медицине и

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

Для внутрикожной пробы применяют сухой очищенный туберкулин (протеин пурифидеи дериват — ППД), предложенный М. А. Линниковой для медицинской практики. В ветеринарии используют стандартизированный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих, который содержит в диагностической дозе 10000 ± 2000 туберкулиновых единиц (ТЕ), то есть 0,2 мг препарата, растворенного в 0,2 мл растворителя.

Сухой очищенный туберкулин для птиц готовят по той же технологии, что и ППД для млекопитающих, — из культурального фильтрата микобактерий туберкулеза птичьего вида и применяют для диагностики у птиц и свиней.

Туберкулин вводят внутрикожно крупному рогатому скоту, буйволам, зебу, верблюдам, оленям — в область средней трети шеи, свиньям — наружной поверхности основания уха, курам — в бородку. С этой целью применяют инъекционные иглы (МРТУ № 46-84-42 или 0612), которые следует менять при каждом наполнении шприца туберкулином. Используют и безыгольные инъекторы марки ИБВ-0,1, БИ-7 «Овод», которые ускоряют и упрощают процесс введения туберкулина.

Изучают реакцию через 72 ч по результатам измерения толщины кожной складки с учетом характера образовавшейся припухлости. При положительной реакции появляется разлитой отек размером 35×45 мм и более, без строго очерченных границ, тестообразной консистенции, с повышенной местной температурой и чувствительностью (болезненность). Кожная складка увеличивается на 3 мм и более. Кожную складку измеряют с помощью кутиметра и по разнице между показателем толщины возникшей припухлости и складки неизмененного участка кожи устанавливают степень увеличения.

Курам туберкулин вводят внутрикожно в одну бородку, вторая служит контролем. Реакцию учитывают через 30–36 ч. Положительная реакция проявляется в виде опухания бородки, она утолщена, тестообразна, горячая и отвисает книзу.

Кроме внутрикожной пробы в определенных случаях используют глазную, подкожную и внутривенную пробы.

Крупный рогатый скот может быть инфицирован возбудителем человеческого, птичьего видов, паратуберкулезными или атипичными микобактериями. Такие животные положительно реагируют на туберкулин млекопитающих, но не являются туберкулезными. Такие реакции называют неспецифическими и разделяют на парааллергические и псевдоаллергические. Первые — результат сенсibilизации крупного рогатого скота атипичными микобактериями, вторые — воздействия возбудителей паразитарных болезней и других факторов.

Для дифференциации аллергических реакций у животных предложен комплексный аллерген (КАМ) из атипичных микобактерий (А. Н. Шаров, 1978).

Иммунитет и средства специфической профилактики. При туберкулезе иммунитет нестерильный, продолжается до тех пор, пока в организме присутствуют живые микобактерии туберкулеза. Роль живых бактерий туберкулеза в образовании иммунитета выявил Р. Кох в опыте повторного заражения больных туберкулезом морских свинок. При их первичном заражении туберкулезными микобактериями под кожу на месте инъекции через 10–14 сут образуется язва, не заживающая до гибели животного. При повторной инокуляции (через 4–6 нед.) той же культуры участок кожи в месте инъекции через 1–3 сут некротизируется, отторгается и образуется весьма быстро заживающая, в противоположность первичной, язва. Этот опыт был назван феноменом Коха.

Механизм формирования иммунитета при туберкулезе до конца не выяснен. Несомненно одно: присутствующие в крови больных антитела (агглютинины, комплементсвязывающие и др.) играют ничтожную роль в защите макроорганизма. Значительную защитную функцию осуществляют Т-лимфоциты, тканевые элементы, образующие специфические бугорки (эпителиоидные, гигантские и лимфоидные клетки). Бугорок может инкапсулироваться и обызвествляться, что приводит к разрушению содержащихся в бугорке микобактерий. И. И. Мечников первый указал на роль макрофагов в разрушении возбудителя туберкулеза. Однако фагоцитоз имеет незавершенный характер и фагоцитированные микобактерии не погибают, а даже сохраняются в макрофагах.

Вакцину против туберкулеза предложили в 1924 г. французские ученые А. Кальметт и К. Герен. В течение 13 лет они культивировали штамм бычьих туберкулезных палочек на картофеле, пропитанном бычьей желчью с 5% глицерина. В результате 230 пересевов культуры, непрерывно подвергавшейся воздействию желчи, авторы получили стойкий вариант с определенными биологическими свойствами. Штамм этот назван культурой BCG (*Bacterium Calmett — Guerin*) — БЦЖ. Кальметт и Герен предложили использовать культуру БЦЖ как безопасную вакцину для иммунизации людей и животных, прежде всего, крупного рогатого скота. В России противотуберкулезные прививки являются одним из важнейших мероприятий в профилактике туберкулеза человека. В ветеринарной практике вакцина БЦЖ не нашла применения.

14.3.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

Паратуберкулез, или паратуберкулезный энтерит, — хроническая болезнь крупного рогатого скота (реже овец), характеризующаяся сначала периодическим, затем постоянным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта. Больное животное погибает от прогрессирующего истощения. На вскрытии отмечают характерное утолщение слизистой оболочки в тощей и подвздошной кишках, напоминающее извилины мозга или гофрированной трубки, а также увеличение мезентериальных лимфатических узлов.

Паратуберкулез крупного рогатого скота, овец и коз зарегистрирован во многих странах и наносит значительный экономический ущерб, особенно племенным и молочным хозяйствам.

Паратуберкулез впервые установил К. Г. Боль (1927), инфекция была занесена в СССР с импортным племенным скотом.

Морфология. Возбудитель *Mycobacterium paratuberculosis* (бактерия *Johne*, названа по имени автора, открывшего микроб в 1895 г.) — самая маленькая микобактерия из всей кислотоустойчивой группы микробов, длиной 0,5–1,5 мкм и шириной 0,2–0,5 мкм, окрашивается по Цилю — Нильсену и Граму. В патологическом материале (комки слизи, пораженные части слизистой кишечника) бактерии характерно располага-

ются в виде кучек, редко одиночно или группами по 2–4 клетки. В окрашенных препаратах «кучки» видны даже при небольшом увеличении микроскопа.

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

Особое значение приобрела среда Вишневого, содержащая аспарагин, щавелевокислый аммоний, сернокислый магний, сернокислое железо, глицерин.

Для роста культур благоприятна температура 38°C. Первые признаки роста с момента посева появляются через 6 нед., иногда — через 7 мес. На плотных средах (яичные среды Петраньяни, Гельберта, Левенштейна, агаризированная среда Сотона) вначале вырастают изолированные серовато-желто-белые маленькие колонии, в дальнейшем приобретающие вид сосочков. С течением времени появляется складчатое наложение.

На жидких средах (Данкина, Вишневого, Дорсета, Бокэ, Генлея) образуется нежная беловато-сероватая пленка, которая через 3–4 мес. культивирования увеличивается в объеме и осаждается на дно пробирки.

Антигенная структура. У микобактерий паратуберкулеза изучена недостаточно. Установлено лишь антигенное родство с *Myc. avium*.

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

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

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

Патогенность. Микобактерии паратуберкулеза поражают крупный рогатый скот (особенно молодняк), буйволов, верблюдов, овец и коз. Лошади, мулы и свиньи не болеют. В качестве лабораторных животных служат кролики, хомяки, мыши. Морские свинки, куры используются для сенсibilизации при изучении аллергии и стандартизации изготавливаемых аллергенов. В течение многих месяцев у инфицированных животных отсутствуют характерные клинические признаки и патологические изменения. Полагают, что в патогенезе инфекции большое значение имеет предшествующая сенсibilизация организма бактериями Ионе. Инкубационный период исключительно продолжительный — от нескольких месяцев до двух лет и более.

Патогенез. Паратуберкулез представляет собой алиментарную инфекцию. Поскольку возбудитель выделяется с калом больных животных, заражение происходит через инфицированные корма, воду, подстилку, пастбище. После попадания возбудителя болезни в пищеварительный канал он проникает через поврежденный эпителий в строму ворсинок тонких кишок и фагоцитируется ретикулярными клетками. Однако при фагоцитозе микобактерии не перевариваются (из-за наличия в оболочке стеариновых кислот и других воскоподобных веществ), а размножаются в них. В результате этого фагоциты сильно увеличиваются в размере и объединяются в клеточные скопления. Внутриклеточное размножение микробов разрушает клетки тканей, а освободившиеся микробы заново фагоцитируются. Возникают крупные скопления микробов и пораженных макрофагов, вызывая атрофию клеток ворсинок кишечной стенки и брыжеечных лимфоузлов и характерное пролиферативное воспаление. Это приводит к нарушению ферментативной, секреторной и всасывающей функций кишечника, а также минерального, солевого и водного обмена, что приводит к интоксикации и истощению организма. У молодняка может возникать бактериемия.

Лабораторная диагностика. Бактериологический диагноз является решающим, особенно в доклиническом периоде болезни. Его устанавливают в основном микроскопией испражнений больного животного. Из фекалий собирают комочки слизи или кровяные сгустки, размазывают их тонким слоем на предметном стекле и после фиксации на пламени окрашивают по Цилю — Нильсену. Просмотру подлежат не менее 8–10 препаратов, ввиду того, что выделение с фекальными массами бактерий Ионе происходит периодически. При отрицательном результате необходимы повторные исследования через различные промежутки времени.

При исследовании фекалий и слизистой оболочки кишечника следует учитывать, что в препарате могут встречаться кроме бактерий Ионе и другие кислотоустойчивые микобактерии: возбудители туберкулеза или атипичные микобактерии. Для дифференциации высевают материал после обработки 5% -м раствором серной кислоты на элективные и обычные питательные среды. Культуры атипичных микобактерий вырастают относительно быстро в течение первых 3 сут, иногда через 10 сут. Микобактерии туберкулеза, находящиеся в материале, отличаются от паратуберкулезных своим расположением, а также патогенностью для лабораторных животных.

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

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

Серодиагностика. При паратуберкулезе, особенно в период его клинического проявления, в сыворотке крови животных при помощи РСК можно обнаружить комплементсвязывающие антитела. В качестве антигена используют спиртовые, ацетоновые или эфирные экстракты бактерий Ионе, обработанные по специальным методикам. Особое диагностическое значение эта реакция приобретает в связи с тем, что она подтверждает клинические формы паратуберкулеза у 85% исследуемых животных,

то есть в такой период, когда аллергическим методом зачастую невозможно подтвердить диагноз. Основной недостаток РСК — ее отрицательные результаты (в большинстве случаев) в доклинический период, а также неспецифические реакции у животных, больных туберкулезом, возбудители которого по антигенной структуре близки к бактерии Йоне.

Аллергическая диагностика. Паратуберкулезный скот реагирует на альттуберкулин для птиц в 80% и на паратуберкулин (ионин) в 94% случаев. Паратуберкулин, изготовленный Вишневым, представляет собой оригинальный препарат. Это фильтрат убитой кипячением 2–3-месячной культуры паратуберкулезных микобактерий, выращенной на специальной синтетической безбелковой среде. Кроме этого, используют альттуберкулин для птиц и стандартный сухой очищенный (ППД) туберкулин для птиц. Крупный рогатый скот исследуют двойной внутрикожной аллергической пробой. Реакцию учитывают после первого введения через 48 ч с помощью измерения величины кожной складки кутиметром. Положительной реакцией считают появление на месте введения туберкулина разлитого отека без строгой конфигурации и границ размерами приблизительно (35×45–100×120) мм и больше, напряженного в центре и тестоватой консистенции по краям, горячего на ощупь и болезненного при пальпации.

При сомнительной реакции — отек со слабо выраженными воспалительными признаками, утолщение кожной складки составляет от 5 до 7 мм сверх нормы. Неспецифические ограниченные безболезненные утолщения участка кожи, если даже толщина складки превышает норму, за типичные аллергические реакции не признают. Реакцию, появившуюся ранее 48 ч после инъекции туберкулина, не учитывают.

Животным, давшим сомнительную и отрицательную реакции и не реагирующим, альттуберкулин вводят повторно. Реакцию учитывают через 24 ч.

Доза альттуберкулина зависит от возраста животных: животным до 2 лет вводят 0,2 мл; от 2 до 3 лет — 0,3; старше 3 лет — 0,4 мл.

Для аллергической диагностики паратуберкулеза у овец применяют стандартный очищенный (ППД) туберкулин для птиц. Овец начинают исследовать с 3-месячного возраста.

Туберкулин вводят однократно в дозе 0,2 мл под кожу нижнего века на 1–1,5 см ниже его края; учитывают реакцию через 48 ч. Животных считают реагирующими положительно, если в месте введения туберкулина возникает характерная воспалительная припухлость.

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

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

14.4. ПАТОГЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ

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

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

Актиномикоз (*Actinomyces*) — хроническая болезнь домашних и некоторых видов диких животных, характеризующаяся образованием соединительнотканых плотных узлов, гранулем, абсцессов и других поражений в различных органах и тканях.



Рис. 24
Actinomyces bovis. Друзы

Морфология. В пораженных тканях, гное *Act. bovis* обнаруживают в виде зерен, напоминающих крупинки песка. Эти структуры получили название «друзы». Друзы состоят из нитей актиномицетов (рис. 24), которые расходятся от центра в радиальном направлении в виде лучей, концы которых колбовидно или булавовидно утолщены.

В центре друзы кроме густо переплетенного мицелия иногда присутствуют палочковидные элементы, окрашивающиеся по Граму в темно-фиолетовый цвет, концы утолщенных гиф мицелия по Граму не окрашиваются, т. е. остаются красными. Механизм такого окрашивания друз по Граму до сих пор не выяснен. Величина друз колеблется от 20–40 до 150–320 мкм; в среднем она достигает 60–80 мкм.

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

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

Культивирование. *Act. bovis* культивируют в анаэробных условиях при оптимальной температуре 37°C на агаре Сабура, глюкозо-красном агаре при pH от 4,4 до 9,0. Рост медленный. На 15–30-е сутки после посева обнаруживают небольшие белые или желтоватые колонии в толще агара. Колонии могут быть гладкими или шероховатыми, напоминающими по виду цветную капусту, пушистыми или мучнистыми, бесцветными или пигментированными (синие, фиолетовые, желтоватые, крас-

ные, коричневые, зеленые, оранжевые и др.). Колонии с трудом снимаются с питательных сред.

При пересевах на МПА, МПЖ, свернутую сыворотку крови крупного рогатого скота, картофель развиваются колонии аэробных актиномицетов, характерной особенностью которых является образование воздушного мицелия, на концах которого формируются споры, придающие поверхности колонии мучнистый вид.

В жидких средах — МПБ, молоке, сахарном бульоне, среде Чапека актиномицет растет в виде зернышек, пушинок или морщинистых пленок.

Биохимические свойства. *Act. bovis* ферментирует с образованием кислоты глюкозу, левулезу, галактозу, глицерин, разжижает желатин, разлагает белок с образованием сероводорода, свертывает молоко с последующей пептонизацией. В отличие от *Act. israeli* чувствителен к стрептомицину и нечувствителен к хлорамфениколу, гидролизует крахмал; на кровяном агаре с 1% -й глюкозой в анаэробных условиях дает слабый гемолиз.

Антигенная структура. *Act. bovis* входит в серогруппу В, *Act. israeli* — в серогруппу D. У того и другого вида выявлены серовары 1 и 2, которые идентифицируют с помощью люминесцирующих антител.

Устойчивость. Актиномицеты весьма устойчивы к действию физико-химических факторов. Особенно резистентны их споры. Нагревание до 70–80°C убивает их в течение 5 мин, под воздействием солнечных лучей они гибнут через 3 ч, лучей ртутно-кварцевой лампы — через 30 мин. Низкая температура консервирует актиномицеты на 1–2 года, высушивание при комнатной температуре не убивает их до 6 лет. Сулема (1:1000) убивает через 1–10 мин, 3% -й раствор формалина — за 5–7 мин, 5% -й раствор хлорамина — за 3 ч, 5% -й раствор лизола — за 30 мин. Лучший дезинфектант — щелочной раствор 3% -го формальдегида.

Патогенность. *Act. bovis* вызывает болезнь у домашних, диких и лабораторных животных. У крупного рогатого скота актиномикозные поражения бывают на языке, коже головы, верхней части шеи, межчелюстного пространства, в костях челюсти, иногда на семенниках.

У свиней поражаются часть миндалин, вымя, реже челюстные кости и язык. У овец и коз локализация процесса и симптомы болезни такие же, как и у крупного рогатого скота. Известны случаи поражения легких. У лошадей актиномикозы могут быть в семенных канатиках, особенно после кастрации.

В экспериментальных условиях можно заразить многих домашних, диких животных, в том числе птиц. В качестве лабораторных животных используют птиц, кроликов, 3–4-недельных хомяков, молодых белых мышей, у которых при внутрибрюшинном заражении развивается активный актиномикоз.

Актиномикозом болеет и человек. Болезнь сопровождается образованием инфильтратов, гнойных очагов, содержащих зерна или нити актиномицетов (так называемые друзы), свищей, вскрывающихся наружу или внутрь организма. Как у животных, так и у людей встречается генерализованный актиномикоз.

Лабораторная диагностика сводится к микроскопическому исследованию содержимого актиномикозных очагов, гноя, экссудата, в которых обнаруживаются друзы, состоящие из нитей актиномицетов. Исследуют как неокрашенные, так и окрашенные препараты.

При изучении морфологии возбудителя актиномикоза в неокрашенных препаратах исследуемый материал смешивают с раствором антибиотиков (пенициллин и стрептомицин из расчета 100 ЕД/мл) в соотношении 1:5 и центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 15–20 мин. Осадок отмывают физиологическим раствором, отбирают друзы (желтоватые крупинки), переносят их на предметное стекло в кашлю 10–20% -го раствора едкой щелочи (KOH, NaOH) и слегка подогревают. Осадок можно также поместить в смесь глицерина с этиловым спиртом в равных объемах или в физиологический раствор (0,85% -й раствор NaCl); микроскопируют вначале при увеличении (10 × 5), а затем при среднем увеличении микроскопа (20–40 × 5–15).

Иммерсионный объектив используют главным образом для просмотра препаратов, окрашенных по Граму. Этот же метод используют для окраски препаратов, приготовленных из культур *Act. bovis*, которые получают путем посева патологического материала на агар Сабуро или другие питательные среды. Наличие в препаратах мицелия и спор является достаточным ос-

нованием при установлении лабораторного диагноза на актиномикоз.

Иммунитет. Природа иммунитета при актиномикозе изучена недостаточно. Считается, что после переболевания животные заражаются повторно, хотя в сыворотках крови переболевших установлены агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие антитела. В качестве антигена используют фильтрат лизированных бульонных культур актиномицетов.

Лечение. Лучшим средством для лечения актиномикоза животных считают йодистые препараты (йодистый калий или йодистый натрий), которые инъецируют в пораженные участки, вводят внутрь (per os) или внутривенно. Применяют пенициллин, стрептомицин.

Не рекомендуется выпасать больных животных на заболоченных пастбищах, а также скармливать им грубые корма.

14.5. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ ПАЛОЧКИ

14.5.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — типичный представитель патогенных бацилл. Относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Этот микроб часто называют бациллой антракса.

Сибирская язва (*Anthrax*) — зооантропоноз. Восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Инфекционный процесс протекает преимущественно остро, с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Болезнь регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и даже эпизоотии. Название болезни предложил в 1789 г. С. С. Андриевский, который изучал ее на Урале и в Сибири.

Микроскопически бацилла сибирской язвы была обнаружена Йоллендером в 1849 г. Французские исследователи Давен и Рейс (1850), а в России профессор Дерптского ветеринарного училища Брауэлл (1857) устанавливали также в крови больных и погибших от сибирской язвы овец наличие нитевидных

неподвижных и неветвящихся телец. Брауэлл одним из первых выявил бациллы в крови человека, умершего от сибирской язвы, и экспериментально заразил животных его кровью. Однако роль этих палочек оставалось невыясненной до 1863 г., когда Давен окончательно установил их в качестве возбудителей сибирской язвы.

Чистые культуры бациллы антракса выделил в 1876 г. в начале Р. Кох, а затем Л. Пастер. Независимо друг от друга они культурами этих микробов воспроизвели болезнь у животных. В России первую культуру сибиреязвенного микроба получил В. К. Высокович в 1882 г.

Р. Кох в 1876 г. доказал, что вегетативные клетки сибиреязвенного микроба обладают способностью формировать споры, в 1888 г. Серафини обнаружил капсулу микроба.

Морфология. Бациллы антракса довольно крупные (1–1,3 × 3,0–10,0 мкм) палочки, неподвижные, грамположительные; образуют капсулу и споры (рис. 25–28). Микроб встречается в двух формах: вегетативной, в виде палочки различной величины клеток (капсульных и бескапсульных), и споровой. Споры могут быть заключены в хорошо выраженный экзоспориум и находиться внутри и вне палочек в виде изолированных телец.

В окрашенных препаратах из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных бациллы располагаются одиночно, попарно и в виде коротких цепочек (3–4 клетки, окруженные капсулой). Концы палочек в цепочках прямые, с резко обрубленными концами, а свободные — слегка закруг-

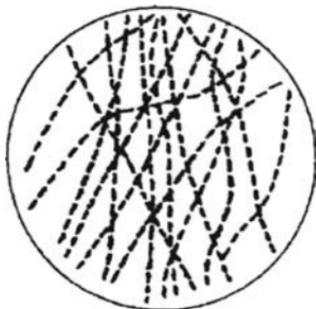


Рис. 25
Bac. anthracis.
Вегетативная культура



Рис. 26
Споры



Рис. 27
Bac. anthracis. Капсулы

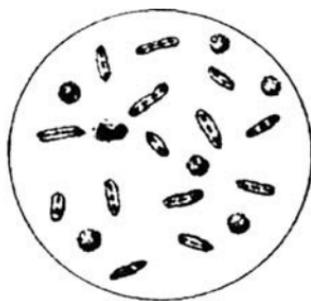


Рис. 28
Bac. anthracis. Капсулы

ленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из культур, на плотных и в жидких питательных средах палочки располагаются длинными цепочками.

В организме или при культивировании на искусственных питательных средах с большим содержанием нативного белка сибиреязвенная бацилла образует капсулу.

Сибиреязвенная бацилла во внешней среде при неблагоприятных условиях существования формирует споры. В каждой вегетативной клетке образуется только одна эндоспора, чаще располагающаяся центрально, реже — субтерминально. Споры овальные, иногда округлые. Размеры зрелых спор колеблются в пределах 1,2–1,5 мкм в длину и 0,8–1,0 мкм в поперечнике.

Культивирование. Сибиреязвенный микроб по способу дыхания относят к факультативным анаэробам: он хорошо размножается в обычных атмосферных условиях и в условиях пониженного содержания кислорода.

Бацилла антракса нетребовательна к условиям питания и хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Кроме того, может расти на различных растительных субстратах: настоях соломы, сена, экстрактах гороха, сои, вики, ломтиках вареного картофеля, свеклы, моркови и др.

Оптимальная температура роста культуры 35–37°C; при температуре ниже 12 и выше 45°C она не растет; оптимум pH среды 7,2–7,6.

На поверхности МПА в аэробных условиях при 37°C первые признаки роста появляются уже через 6–8 ч после посева,

17–24-часовые культуры имеют вид серовато-беловатых колоний с неровными краями и шероховатой поверхностью диаметром 3–5 мм. От их краев отходят завитки. Под лупой или малым увеличением микроскопа колонии имеют локонообразную структуру, что характерно для типичных вирулентных штаммов, образующих R-форму.

В МПБ и других жидких средах сибиреязвенная бацилла (K-форма) через 16–24 ч образует на дне пробирки рыхлый белый осадок, сам бульон остается прозрачным, при встряхивании осадок разбивается на мелкие хлопья. Некоторые штаммы растут в виде нежных мелких хлопьев, взвешенных в столбике бульона, которые через 48 ч оседают на дно. Отдельные штаммы на 3–4-е сутки дают рыхлое пристеночное кольцо, пленка на поверхности среды не образуется.

Весьма характерный рост отмечают в столбике желатина при посеве уколом. По ходу укола на 2–5-е сутки появляется серовато-белый стержень, от которого под прямым углом радиально отходят нежные боковые отростки — более длинные по мере приближения к поверхности среды и постепенно укорачивающиеся по направлению вниз. Такая культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатина начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка.

В молоке *B. anthracis* размножается быстро, вырабатывает кислоту и через 2–4 сут оно свертывается с последующей пептонизацией сгустка. На картофеле образует обильный, сухой, серо-белый налет, иногда с кремовым оттенком. Агаровые и бульонные культуры некоторых штаммов интенсивно окрашиваются в светло-коричневый цвет вследствие окисления тирозина.

Биохимические свойства. *B. anthracis* вырабатывает следующие ферменты: липазу, диастазу, протеазу, желатиназу, дегидразу, цитохромоксидазу, пероксидазу, каталазу и др. Некоторые штаммы образуют сероводород, особенно это свойство проявляется в средах, богатых пептонами; выделяют аммиак. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, медленно сахарозу, трегалозу, фруктозу и декстрин. На средах с глицерином и салицином возможно слабое кислотообразование. Арабинозу, рамнозу, галактозу, маннозу, рафино-

зу, инулин, маннит, дульцит, сорбит, инозит не сбраживает. Утилизирует цитраты, образует ацетал-метилкарбинол и вследствие этого дает положительную реакцию Фогеса — Проскауэра. Синтезирует лецитиназу и медленно коагулирует растворы желтка куриного яйца. Редуцирует метиленовый синий и восстанавливает нитраты в нитриты. Вырабатывает желатиназу, а также протеазу и достаточно быстро гидролизует желатин и свернутую сыворотку.

Токсинообразование. Бацилла антракса образует сложный экзотоксин, включающий три компонента (фактора): эдематогенный фактор (ЕF), протективный антиген (РА) и летальный фактор (LF), или соответственно факторы I, II, III. Их синтезируют капсульные и бескапсульные варианты микроба. Эдематогенный фактор представляет собой липопротеин, вызывает местную воспалительную реакцию — отек и разрушение тканей.

Протективный антиген — носитель защитных свойств, обладает выраженным иммуногенным действием. В чистом виде нетоксичен. Летальный фактор сам по себе нетоксичен, но в смеси со II фактором (РА) вызывает гибель белых крыс, мышей и морских свинок. Протективный антиген и летальный фактор — гетерогенные в молекулярном отношении белки. Все три компонента токсина составляют синергическую смесь, оказывающую одновременно эдематогенное и летальное действия, каждый из них обладает выраженной антигенной активностью и серологически активен.

Инвазивные свойства микроба обусловлены капсульным полипептидом d-глутаминовой кислоты и экзоферментами.

Антигенная структура. В состав антигенов бациллы антракса входят неиммуногенный соматический полисахаридный комплекс и капсульный глутаминполипептид. Полисахаридный антиген не создает иммунитета у животных и не определяет агрессивных функций бациллы: всегда присутствует как у вирулентных, так и у авирулентных штаммов. В связи с тем что полисахарид тесно связан с телом бактериальной клетки, он получил название соматического антигена. Сибиреязвенный соматический антиген очень часто обозначают буквой С, капсульный полипептид — буквой Р. Капсульный антиген бациллы антракса представлен сложным полипептидом d-глутаминовой кислоты; его принимают за группо-специфическое вещество, так

как он дает перекрестные серологические реакции с полипептидом *B. subtilis*, *B. cereus* и *B. megaterium*. Активными антигенами также являются все три компонента сибиреязвенного экзотоксина.

Устойчивость. Устойчивость и длительность выживания у вегетативных клеток и спор возбудителя сибирской язвы различны. Вегетативные формы относительно лабильны, споры обладают высокой резистентностью.

В не вскрытом трупe вегетативная форма микроба в результате воздействия протеолитических ферментов разрушается уже в течение 2–3 сут, в зарытых трупах сохраняется до 4 сут, через 7 сут завершается лизис бактерий даже в костном мозге. В желудочном соке при 38°C гибнет через 30 мин, в замороженном мясе при –15°C жизнеспособна 15 сут, в засоленном мясе — до 1,5 мес. Навозная жижа, смешанная с сибиреязвенной кровью, губительно действует на вегетативные клетки уже через 2–3 ч, однако споры остаются в ней вирулентными в течение многих месяцев и лет. Споры в запаянных ампулах сохраняют жизнеспособность и вирулентность до 63 лет, а в почве — более 60 лет.

К воздействию различных химических веществ вегетативные клетки малоустойчивы. Спирт, эфир, 2% -й формалин, 5% -й фенол, 5–10% -й хлорамин, свежий 5% -й раствор хлорной извести, пероксид водорода разрушают их в течение 5 мин.

Для уничтожения споровой формы возбудителя необходима более длительная экспозиция. Этиловый спирт в концентрациях от 25% до абсолютного разрушает споры в течение 50 сут и более, 5% -й фенол и 5–10% -й раствор хлорамина — через несколько часов и даже суток, 2% -й раствор формалина — через 10–15 мин, 1% -й раствор пероксида водорода — через 1 ч, 10% -й раствор гидроксида натрия — через 2 ч.

На споры высушивание не оказывает губительного действия: сухой жар при 120–140°C убивает споры только через 2–3 ч, при 150°C — через 1 ч.

Вегетативные клетки малоустойчивы к высоким температурам. При нагревании до 50–55°C гибнут в течение 1 ч, при 60°C — через 15 мин, при 75°C — через 1 мин, при кипячении — мгновенно. Они чувствительны к высушиванию, однако при

медленном высушивании происходит спорообразование, и микроб не гибнет. К низким температурам бактерии малочувствительны: при -10°C сохраняются 24 сут, при -24°C до 12 сут. Воздействие прямого солнечного света обезвреживает бактерии через несколько часов.

Возбудитель сибирской язвы проявляет высокую чувствительность к пенициллину, хлортетрациклину и левомицетину, а также к литическому действию лизоцима.

Патогенность. К возбудителю сибирской язвы восприимчивы все виды млекопитающих. В естественных условиях чаще болеют овцы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, реже — ослы и мулы. Чрезвычайно восприимчивы козы, буйволы, верблюды и северные олени. Сибирская язва у свиней протекает, как правило, хронически, с длительным бациллоносительством. Среди диких животных восприимчивы все травоядные. Известны случаи заболевания собак, волков, лисиц, песцов, среди птиц — уток и страусов.

Патогенез. Бацилла антракса обладает выраженной инвазивностью и легко проникает через царапины кожных покровов или слизистых оболочек. Заражение животных происходит преимущественно алиментарным путем. Через поврежденную слизистую оболочку пищеварительного тракта микроб проникает в лимфатическую систему, а затем — в кровь, где фагоцитируется и разносится по всему организму, фиксируясь в элементах лимфоидно-макрофагальной системы, после чего снова мигрирует в кровь, обуславливая септицемию.

Размножаясь в организме, бацилла антракса синтезирует капсульный полипептид и выделяет экзотоксин. Капсульное вещество ингибирует опсонизацию, в то время как экзотоксин разрушает фагоциты, поражает центральную нервную систему, вызывает отек, гипергликемию и повышение активности щелочной фосфатазы.

В терминальной фазе процесса в крови снижается содержание кислорода до уровня, несовместимого с жизнью. Резко нарушается метаболизм, развивается вторичный шок и наступает гибель животных.

Возбудитель сибирской язвы может выделяться из организма с бронхиальной слизью, слюной, молоком, мочой и испражнениями.

Лабораторная диагностика. При подозрении на сибирскую язву воспрещается вскрывать трупы павших животных. Для лабораторного исследования чаще всего направляют ухо павшего животного или толстые нефиксированные мазки крови из надреза сосуда на предметном стекле. При вынужденном убое или подозрении на сибирскую язву во время вскрытия осторожно отбирают кусочки селезенки, печени, измененные лимфоузлы, от трупов свиней — кусочки отечных тканей в области глотки и заглоточные лимфоузлы. Материал должен быть свежим: в разложившихся тканях бацилла антракса подвергается лизису. Направляют также пробы почвы, фуража, воды, шерсти и кожевенно-мехового сырья; объектами для серологического исследования в реакции преципитации служат пробы кожевенно-мехового сырья и разложившиеся ткани.

Исследование проводят по обычной схеме: бактериоскопия мазков, выделение и изучение свойств чистой культуры, биопроба на лабораторных животных, при необходимости, серологические исследования — реакция преципитации и иммунофлюоресцентный анализ.

Бактериоскопия: из патологического материала готовят мазки, часть которых красят по Граму и обязательно на наличие капсулы — по Михину, Ребигеру, Ольту и др. Важным диагностическим признаком является обнаружение типичных по морфологии капсульных палочек.

Посев на питательные среды: исходный материал засевают в МПБ и на МПА (рН 7,2–7,6), посевы инкубируют при 37°C в течение 18–24 ч; при отсутствии роста выдерживают в термостате еще 2 сут. Культуры просматривают, определяют их типичность, готовят препараты, микроскопируют. В мазках из культур обнаруживают бескапсульные палочки, расположенные длинными цепочками, и споры.

Биологическая проба: заражают белых мышей, морских свинок, кроликов одновременно с посевом материала на питательные среды. Белым мышам вводят подкожно в заднюю часть спины (по 0,1–0,2 мл), морским свинкам и кроликам — под кожу в область живота (по 0,5–1,0 мл). Мыши погибают через 1–2 сут, морские свинки и кролики — через 2–4 сут. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови, серд-

ца, селезенки, печени и инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Идентификация бациллы антракса. В природе существует несколько видов аэробных споровых сибиреязвенноподобных сапрофитов: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и *B. subtilis*. Так как они по морфологии и культуральным признакам во многом сходны с бациллой антракса, то часто при лабораторной диагностике возникает необходимость решить вопрос: выделена ли культура возбудителя сибирской язвы или подобного ему сапрофита?

Идентификацию и дифференциацию культуры проводят на основании главных и дополнительных признаков. К главным относят патогенность, капсулообразование, определение подвижности, тест «жемчужного ожерелья», пробу со специфическим фагом, иммунофлюоресцентный тест, к дополнительным — тесты на отсутствие гемолиза и лицетиназной активности, образование фосфатазы.

Бацилла антракса патогенна для лабораторных животных. Сибиреязвенноподобные сапрофиты не вызывают их гибель, за исключением *B. cereus*, которая убивает белых мышей при внутрибрюшинном заражении. Массивную с четкими контурами капсулу в организме образует только возбудитель сибирской язвы.

Тест «жемчужного ожерелья», предложенный в 1953 г. Иенсенем и Клеемейером, основан на способности пенициллина угнетать синтез клеточной стенки бациллы антракса и образовывать сферопласты. Испытуемую трехчасовую бульонную культуру высевают на МПА в чашки Петри: в первой чашке содержится 0,5, во второй — 0,05 ЕД пенициллина в 1 мл среды, третья — контрольная. Посевы инкубируют 3 ч при 37°C. На агаре с пенициллином бацилла антракса растет в виде цепочек, состоящих из шарообразных клеток, напоминающих ожерелье из жемчуга. Сибиреязвенноподобные сапрофиты на агаре с пенициллином этого феномена не образуют.

Проба с бактериофагом (лизабельность фагом): сибиреязвенный фаг, взаимодействуя с гомологичной культурой, вызывает ее лизис. Эту высокоспецифичную реакцию применяют для идентификации бациллы антракса, а также дифференциации ее от ложносибиреязвенных бацилл. В качестве индикатора в России выпускают фаг ВНИИВВиМ, гамма-фаг МВА.

Иммунофлюоресцентный тест: идентификация возбудителя сибирской язвы при помощи флюоресцирующих антител — ориентировочный метод, который требует дополнительного изучения вирулентности, капсулообразования, фагочувствительности.

Подвижность устанавливается микроскопически или путем посева культуры уколом в столбик 0,3% -го МПА. Неподвижные культуры растут только по ходу укола, подвижные — дают диффузный рост. Возбудитель сибирской язвы неподвижен, тогда как многие спорообразующие аэробные сапрофиты подвижны.

Гемолитическая активность не может быть надежным критерием дифференциации: как правило, бактерии антракса не гемолизуют эритроциты барана или же лизируют их очень медленно и незначительно, но этот признак у разных штаммов variabelен.

Лецитиназная активность у возбудителя сибирской язвы низкая: медленно свертывает или вообще не свертывает желток куриного яйца. *B. cereus* интенсивно синтезирует лецитиназу и вызывает свертывание желтка через 6–10 ч. Не образует бактерия антракса и фосфатазу, в то время как сапрофитные споровые аэробы ее продуцируют.

Серологическое исследование: для обнаружения сибирезывенных антигенов применяют реакцию преципитации по Асколи. Эту реакцию используют для исследования на сибирскую язву кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала, в котором происходит лизис бактерии антракса, а также для исследования свежего патологического материала и серологической идентификации выделенных культур. РП по Асколи — достоверный и широко применяемый в практике тест серологической диагностики сибирской язвы. В качестве серологического теста, главным образом для изучения антигенного спектра бактерии антракса, применяют реакцию диффузионной преципитации (РДП).

Для идентификации и дифференциации возбудителя сибирской язвы от сходных микроорганизмов применяют селективную агаровую среду для выявления щелочной фосфатазы по изменению цвета колоний после воздействия паров аммиака. При этом сибирезывенные колонии цвет не изменяют. С целью дифференциации от антракоидов рекомендована реакция диск

преципитации, которая сочетает бактериологическую и серологическую диагностику.

Для выявления свежих случаев и ретроспективной диагностики сибирской язвы у животных предложен аллерген ВНИИВВиМ.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Соматические полисахариды и капсульные полипептиды глютаминовой кислоты бациллы антракса не способны обусловить синтез защитных антител. Эту функцию у бациллы антракса выполняет протективный антиген: будучи одним из факторов патогенности, он обуславливает формирование иммунитета к этой инфекции по типу антитоксического.

В настоящее время защитные антитела обнаруживают при помощи РСК, РДП и непрямого варианта метода флюоресцирующих антител в сыворотках животных, вакцинированных сибирезвненным протективным антигеном или живыми споровыми вакцинами.

Переболевание животного сибирской язвой или же его вакцинация сопровождаются развитием гиперчувствительности замедленного типа. В результате естественного заражения и переболевания сибирской язвой у животных возникает длительный иммунитет.

Активная защита животных от сибирской язвы путем вакцинации — надежное средство профилактики данного заболевания. С этой целью применяют живые споровые сибирезвненные вакцины.

Н. Н. Гинсбург в 1940 г. селекционировал из культуры вирулентного штамма вакцинный бескапсульный мутант СТИ-1. С 1942 г. вакцину СТИ, приготовленную из этого варианта, используют для профилактики сибирской язвы животных. Она зарекомендовала себя как высокоиммунный препарат. В настоящее время вакцину СТИ в споровой форме применяют для вакцинации животных против сибирской язвы. Иммунитет наступает через 10 сут и длится не менее 12 мес.

Новую вакцину против сибирской язвы из бескапсульного авирулентного штамма 55 выпускают в жидком и лиофилизированном виде. Вакцину вводят животным, начиная с 3-месячного возраста, однократно подкожно. Иммунитет наступает через 10 сут и сохраняется около 1 года.

В практике используют также живую вакцину ВГНКИ, ассоциированную живую вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота.

Для лечения и пассивной профилактики применяют антибиотики, противосибиреязвенную гипериммунную сыворотку и гамма-глобулин. Пассивный иммунитет наступает через несколько часов и сохраняется до 14 сут.

14.6. ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ

14.6.1. КЛОСТРИДИИ – ВОЗБУДИТЕЛИ АНАЭРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Микроорганизмы из группы патогенных анаэробов обладают способностью вызывать тяжело протекающие инфекционные болезни и токсикозы у животных и человека. Патогенные анаэробы — это преимущественно клостридии, к ним также принадлежит возбудитель некробактериоза.

Клостридии — многочисленная группа почвенных анаэробных бактерий, включающая 61 вид; однако только 12 из них — патогенные микроорганизмы. Патогенные клостридии относятся к семейству *Bacillaceae*, роду *Clostridium*.

Для различных представителей рода клостридии характерны: способность к сапрофитическому существованию; высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям окружающей среды благодаря спорообразованию; широкое повсеместное распространение — типичными местами их обитания и размножения служат почва и желудочно-кишечный тракт животных.

Важнейшими возбудителями анаэробных клостридиозов являются: *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*.

14.6.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ СТОЛБНЯКА

Возбудитель столбняка — *C. tetani*. Вызывает остро протекающую неконтагиозную раневую инфекцию, при которой нервная система поражается экзотоксином микроба.

Болезнь возникает в результате различных травм и ранений при условии внесения в них спор возбудителя, что возмож-

но при попадании почвы, и сопровождается тоническими и клоническими судорогами мышц.

Возбудитель столбняка открыт Н. Д. Монастырским (1883) и А. Николайером (1884), чистую культуру выделил в 1889 г. С. Китагато.

Морфология. *C. tetani* — крупная тонкая палочка с закругленными концами длиной 3–12 и шириной 0,3–0,8 мкм. В препаратах из пораженных тканей бактерии располагаются отдельно и группами по 2–3 клетки; из культур, особенно молодых, в жидких средах — в виде длинных изогнутых нитей. Столбнячная палочка подвижна (перитрих), имеет до 20 и более жгутиков; в старых культурах преобладают клетки без жгутиков. Капсулу не образует. Круглые споры, располагающиеся терминально (рис. 29), в 2–3 раза шире клетки, в результате этого бактерия приобретает вид барабанной палочки.

Споры формируются в культурах обычно через 2–3 сут, они также образуются и в организме. Палочки со спорами неподвижны. На 4–6-е сутки культуры в жидких средах состоят исключительно из спор и почти не содержат вегетативных клеток, которые лизируются.

Вегетативные клетки хорошо окрашиваются спиртово-водными растворами анилиновых красок. Грамположительные, но в старых культурах часть бактерий грамотрицательные.

Культивирование. Возбудитель столбняка — строгий анаэроб. На поверхности плотных питательных сред растет в условиях анаэробноз при остаточном давлении не выше 0,7 кПа. Оптимальные условия: рН 7,4–7,6 и температура 36–38°C; границы роста лежат в пределах 14–43°C.

В среде Китта — Тароцци возбудитель растет медленно; обычно через 24–36 ч появляется интенсивное равномерное помутнение с незначительным газообразованием в виде единичных пузырьков, к 5–7-м суткам выпадает рыхлый осадок, среда при этом становится прозрачной. Культуры, особенно на 3–5-е сутки роста, издают своеобразный запах жженого рога.

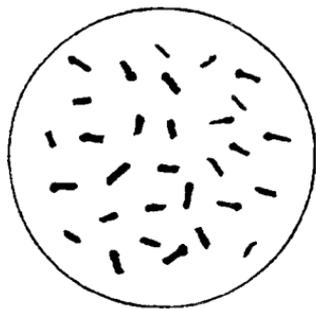


Рис. 29
C. tetani. Споры

На глюкозо-кровоном агаре в анаэробных условиях образует нежные беловато-серые колонии с отростками и приподнятым центром, иногда мелкие круглые, напоминающие капельки росы. Колонии окружены слабой зоной гемолиза (2–4 мм). Если чашки дополнительно выдержать при комнатной температуре, зона гемолиза увеличится, при обильном посеве гемолиз может быть по всей поверхности среды. В высоком столбике агара через 1–2 сут вырастают плотные колонии, напоминающие чечевичное зерно, иногда диск (R-форма). В столбике желатина через 5–12 сут появляется рост в виде елочки и происходит медленное разжижение субстрата. Молоко свертывается медленно, с образованием на 5–7-е сутки мелких сгустков казеина, мозговая среда чернеет при продолжительном культивировании.

Биохимические свойства. В отличие от других патогенных клостридий возбудитель столбняка характеризуется слабой биохимической активностью: не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты. Однако некоторые штаммы могут ферментировать глюкозу в зависимости от концентрации в среде ионов железа.

C. tetani обладает слабыми протеолитическими свойствами, вызывая медленную ферментацию протеинов и пептонов до аминокислот, которые затем разлагаются с образованием угольной кислоты, водорода, аммиака, летучих кислот и индола.

Токсинообразование. Возбудитель столбняка лишен факторов инвазивности, но обладает способностью синтезировать экзотоксин высокой активности. Столбнячный токсин получен и описан Э. Берингом и С. Китагато (1890). Токсин обуславливает всю специфику патогенеза и клиническую картину столбняка.

В составе столбнячного экзотоксина два компонента — тетаноспазмин и тетанолизин (тетаногемолизин). Первый избирательно действует на нервную систему и вызывает тонические сокращения поперечно-полосатых мышц, второй — неспецифический гемолиз эритроцитов. Тетаноспазмин — основной токсический фактор, обладающий свойством нейротоксина, поражающего моторные нейроны центральной нервной системы; цитопатический эффект в отношении клеток других тканей не проявляет. Вырабатывается в организме и культурах на вторые сутки инкубирования и достигает максимума на 5–7-е сут-

ки. Очищенный кристаллизованный тетаноспазмин — термолабильная протеаза, состоящая из 13 аминокислот с преобладанием аспарагина. Токсичность кристаллического тетаноспазмина составляет $66 \cdot 10^6$ ЛД₅₀ для белых мышей на 1 мг азота токсина.

Тетанолизин — разрушающийся в присутствии кислорода гемолизин, имеющий общие свойства с бета-токсином *C. perfringens*, пневмолизинем пневмококков и О-стрептолизинем гемолитических стрептококков. В культуральной жидкости накапливается в значительном количестве уже через 20–30 ч; в старых культурах разрушается. Обладает гемолитическим, кардиотоксическим и летальным действиями.

Процессы образования тетаноспазмина и тетанолизина взаимно не обусловлены: некоторые штаммы могут продуцировать большое количество тетанолизина и малое — тетаноспазмина.

Экзотоксин возбудителя столбняка нестойк и легко разрушается при высокой температуре (при 60°C — через 30 мин, при 65°C — через 5 мин), а также под влиянием прямых солнечных лучей, ионизирующих излучений и химических веществ: перманганата калия, азотнокислого серебра, йода, кислот, щелочей. Антибиотики и сульфаниламиды не разрушают этот токсин; он не проникает через стенку кишечника и не инактивируется ферментами желудочно-кишечного тракта. Под действием формалина при 35–38°C переходит в анатоксин — нетоксический иммуногенный препарат.

К ферментам патогенности клостридий столбняка следует отнести РНК-азу и фибринолизин. РНК-аза токсична для лейкоцитов и ингибирует фагоцитоз; фибринолизин способствует всасыванию тетаноспазмина.

Антигенная структура столбнячного токсина изучена недостаточно. Подвижные штаммы клостридий столбняка в составе имеют соматический О- и жгутиковый Н-антигены. Термолабильный Н-антиген определяет типовую специфичность микроба. Описано 10 сероваров возбудителя столбняка различающихся по структуре Н-антигена, обозначаемых цифрами I, II, III, IV и т. д. В природе чаще других встречаются серовары I и II. Все они продуцируют иммунологически однородный экзотоксин, нейтрализуемый противостолбнячной сывороткой. Термостабильный О-антиген относится к групповым.

Устойчивость. Вегетативные клетки *C. tetani* малоустойчивы к воздействию различных факторов внешней среды. Температура 60–70°C убивает столбнячные палочки в течение 30 мин, растворы обычных дезинфицирующих препаратов — через 15–20 мин.

Споры, напротив, весьма резистентны. В почве, высохшем кале, на различных предметах (гвозди, щепки, сельскохозяйственные орудия, колючки растений и др.), защищенных от света, они сохраняются в течение многих лет (так, например, на кусочке сухого дерева — до 11 лет). Прямой солнечный свет инактивирует споры через 3–5 сут. Во влажной среде при нагревании до 80°C они сохраняют жизнеспособность 6 ч, а при нагревании до 90°C — 2 ч. При кипячении споры погибают через 30–50 мин, сухой жар (115°C) разрушает их только через 20 мин. Они также относительно устойчивы к различным дезинфектантам: 1%-й раствор сулемы и 5%-ный раствор фенола убивают их через 8–10 ч; 5%-й раствор креолина — за 5; 1%-й раствор формалина — за 6 ч; 0,5%-й раствор соляной кислоты — за 30 мин; 10%-я настойка йода — за 10; 1%-й раствор азотнокислого серебра — за 1 мин.

Патогенность. К столбняку восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных, но наиболее чувствительны лошади. Болеют также собаки, кошки и дикие млекопитающие. Описаны случаи столбняка у кур, гусей и индюков. К столбнячному токсину исключительно восприимчив человек. Холоднокровные — лягушки, змеи, черепахи, крокодилы — невосприимчивы к столбняку при температуре ниже 20°C, но введенный токсин длительное время циркулирует в их организме.

Из лабораторных животных наиболее восприимчивы белые мыши, морские свинки и кролики. Инкубационный период у белых мышей продолжается до 36 ч, у морских свинок — до 48 ч, у кроликов — до 3–4 сут. Болезнь у них развивается по типу общего или восходящего (*tetanus ascendens*) столбняка. Особенно характерно клиническая картина проявляется у белых мышей, а именно: ригидность хвоста и инокулированной лапки — конечность вытянута, ограничена в подвижности, туловище искривлено в сторону инокулированной лапки, постепенно процесс захватывает и вторую половину тела. Положенная на спину мышь не может самостоятельно перевернуться. Поги-

бающие животные принимают характерную позу с искривлением тела и вытянутыми лапками. Время наступления гибели — 12 ч до 5 сут.

Патогенез. Основной патогенетический фактор при столбняке — экзотоксин и, прежде всего, тетаноспазмин, представляющий собой нейротоксин. Он не поражает кожу и не оказывает цитотоксического действия. Ферменты протеазы и фибринолизин, расплавляя кровяные сгустки и тромбы, способствуют распространению токсина за пределы очага размножения микробов. При глубоком ранении споры в условиях анаэробно-биоза быстро вегетируют, происходит интенсивное размножение бактерий и синтез токсина.

Экзотоксин поражает двигательные нервные центры, спинной и головной мозг, что в конечном итоге обуславливает основной симптомокомплекс столбняка. Под влиянием токсина снижается активность холинэстеразы и соответственно гидролиз ацетилхлорида, неизбежно провоцирующий его избыточное образование, вследствие чего концевая пластинка нервно-мышечного синапса приходит в состояние повышенного автоматического возбуждения. Судороги приводят к расстройству дыхания, развиваются ларинготрахеоспазм, гипоксия, респираторный и метаболический ацидоз. Под действием избыточного количества молочной кислоты возможен отек мозга. Животные погибают в результате асфиксии или паралича сердца.

Лабораторная диагностика. В лабораторию для исследования направляют кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, гной, выделения из ран. При генерализации процесса возбудитель можно обнаружить во внутренних органах, поэтому берут от трупа кусочки печени и селезенки массой по 20–30 г и 10 мл крови. При возникновении столбняка вследствие родов или аборта направляют выделения из влагалища и матки, а при подозрении — труп новорожденного животного.

При исследовании выделяют возбудитель столбняка и его токсин. Мазки окрашивают по Граму. Наличие в препаратах грамположительных палочек с круглыми терминальными спорами дает основание подозревать столбняк. Однако нередко находят сапрофитные бактерии (*C. tetanomorphum* и *C. putrificum*), очень похожие на клостридии столбняка. Поэтому микроскопия имеет только ориентировочное значение.

Материал засевают в среду Китта — Тароцци. Культуру микроскопируют и, если она загрязнена, прогревают 20 мин при 80°C или 2–3 мин при 100°C. Затем производят пересев методом фракционирования на чашки Петри с глюкозо-кровяным агаром и выращивают в анаэробных условиях. После появления роста отбирают характерные колонии и производят отсев для выделения чистой культуры.

Биопробу проводят для обнаружения токсина в патологическом материале и культуре. Исследуемый материал растирают в стерильной ступке с кварцевым песком, добавляют двойной объем физиологического раствора. Смесь выдерживают 60 мин при комнатной температуре, после чего фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр. Фильтрат вводят внутримышечно в бедро задней лапки двум мышам в дозе 0,5–1 мл. Для достижения более быстрого результата рекомендуют вводить фильтрат в область корня хвоста в смеси с хлористым кальцием.

Если исследуют культуру возбудителя, то для накопления токсина ее предварительно выдерживают при 37–38°C в термостате 6–10 сут, фильтруют (или центрифугируют) и вводят в дозе 0,3–0,5 мл двум белым мышам.

Биопробу можно проводить и на морских свинках. Животные погибают обычно за время от 12 ч до 5 сут. Наблюдают за подопытными животными не менее 10 сут.

Столбнячный токсин в культурах может быть обнаружен и при помощи реакций нейтрализации (РН) и непрямой гемагглютинации (РНГА) с танизированными эритроцитами.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У животных некоторых видов отмечается естественная устойчивость к столбняку. Известно, что крупный рогатый скот и свиньи болеют реже, чем другие виды животных. Предполагают, что к ним с кормом поступают споры возбудителя столбняка, которые вегетируют в пищеварительном тракте с образованием токсина, который, всасываясь в очень небольших количествах, вызывает иммунитет. В нативных сыворотках коров, зебу, буйволов, баранов обнаруживают столбнячный антитоксин, в меньшем количестве его находят в сыворотках лошадей и верблюдов.

Принято считать, что иммунитет при столбняке в основном антитоксический. Вакцинация животных столбнячным анаток-

сином сообщает им стойкий и напряженный иммунитет, продолжающийся несколько лет. В 1924 г. французские исследователи Рамон и Декомбе получили анатоксин, который в дальнейшем активно использовали для профилактики столбняка.

У нас в стране используют высокоэффективный концентрированный столбнячный анатоксин, представляющий собой преципитат 1%-го квасцового анатоксина, изготовленный из нативного столбнячного токсина путем обработки его формалином, теплом, алюмокалиевыми квасцами и фенолом. Применяют его с профилактической целью в местностях, энзоотически неблагополучных по столбняку, особенно там, где зарегистрированы частые случаи заболевания взрослых животных и молодняка. Иммунитет наступает через 30 сут после прививки и сохраняется у лошадей в течение 3–5 лет, у других видов животных — не менее 1 года.

Для пассивной иммунизации и лечения больных животных предложена антитоксическая противостолбнячная сыворотка гипериммунизированных столбнячным анатоксином лошадей.

14.6.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ БОТУЛИЗМА

Возбудитель ботулизма *C. botulinum* вызывает остро протекающий кормовой токсикоз. Болезнь развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Ботулизм описан в середине XVIII в., его название связано с появлением болезни у людей в результате употребления в пищу кровяной колбасы (*лат. botulus* — колбаса). Возбудитель же был открыт в 1896 г. Ван Эрменгемом, который выделил его из зараженной ветчины, а также селезенки человека, погибшего от ботулизма.

Дальнейшее изучение показало, что в природе существует семь сероваров *C. botulinum* (А, В, С, D, Е, F и G), которые различаются между собой по антигенной структуре экзотоксинов.

Морфология. *C. botulinum* в окрашенных препаратах имеет вид палочек с закругленными концами длиной 4–9 и шириной 0,6–0,8 мкм. Бактерии располагаются изолированно или парами, иногда в виде коротких цепочек. Микроб подвижен

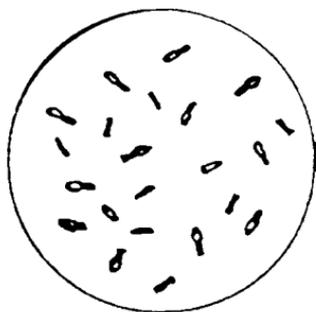


Рис. 30
C. botulinum. Споры

(перитрих); большинство клеток из старых культур без жгутиков. Образует споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально. Палочки со спорами имеют вид теннисных ракеток. Капсулы не образуют (рис. 30).

Вегетативные клетки хорошо окрашиваются спиртоводными растворами анилиновых красок: грамположительные — в молодых культурах и на препаратах из тканей, грамотрицательные — в старых культурах.

рицательные — в старых культурах.

Культивирование. Возбудители ботулизма — строгие анаэробы. На поверхности плотных питательных сред они растут, если остаточное давление воздуха не превышает 8 кПа. Для культивирования применяют специальные среды: глюкозо-кровоной агар Цейслера, печеночный агар с глюкозой, агар столбиком с глюкозой, среду Китта — Тароцци, бульон Хоттингера под вазелиновым маслом с кусочками мяса или печени и 0,5–1% глюкозы.

Оптимальная температура для роста и токсинообразования бактерий сероваров А, В, С, D составляет 35°C, для сероваров Е и F — 28–30°C. Споры возбудителей ботулизма сероваров Е и F могут прорасти, размножиться и образовывать токсин даже при 4°C, развитие и токсинообразование сероваров А и В возможно при 10–55°C. Оптимум рН 7,4–7,7.

В среде Китта — Тароцци происходит помутнение, затем появляется осадок и жидкость светлеет, культура издает запах прогорклого масла.

На агаре Цейслера вырастают прозрачные колонии — «рошинки» величиной в несколько миллиметров с ровными или изрезанными краями и блестящей поверхностью, окруженные зоной гемолиза. Колонии окрашены в слегка коричневатый или серовато-мутный цвет, их середина вогнутая или выпуклая. Крупные колонии более плоские. Колонии одного штамма могут быть нескольких типов. В агаре столбиком колонии имеют форму чечевиц или комочков ваты с уплотненным центром.

Биохимические свойства. *C. botulinum* среды с сахарами ферментирует с образованием газа и кислоты глюкозу, левулезу, мальтозу, глицерин, декстрин, салицин, адонит, инозит и не разлагает галактозу, сахарозу, дульцит, маннит, арабинозу и рамнозу. Однако эти свойства непостоянны и не могут служить критерием идентификации микроба и дифференциации его сероваров.

Бактерии сероваров А и В обладают высокой протеолитической активностью: полностью переваривают кусочки печени и мышц в жидких средах; у серовара F протеолитические свойства выражены слабее и минимальны у сероваров С, D и E.

Токсинообразование. В анаэробных условиях в организме животных, субстратах растительного и животного происхождения, а также на специальных питательных средах *C. botulinum* синтезирует чрезвычайно сильный экзотоксин (особенно серовар А), относящийся к группе нейротоксинов.

Каждый из семи сероваров возбудителя ботулизма образует токсин, имеющий только ему присущую антигенную структуру. В составе токсина различают не менее пяти факторов: нейротоксин, гемолизин, гемолизин-гемагглютинин, липазу и протеазу. Токсическими факторами *C. botulinum* также служат ферменты патогенности и среди них протеиназы, лецитиназы и декарбоксилазы.

Антигенная структура. Все семь сероваров экзотоксина обладают иммунологической специфичностью, выявляемой в реакции нейтрализации. Специфичность токсинов сероваров А, В и E очень высока, С и D — несколько ниже. Токсины сероваров С и D не нейтрализуются антитоксинами А, В и E, но их небольшие дозы перекрестно нейтрализуются большими количествами антитоксинов D и C. Известен также факт перекрестной нейтрализации специфическими антисыворотками ботулинических токсинов сероваров E и F.

Возбудители ботулизма имеют жгутиковый H- и соматический O-антигены, выявляемые в реакции агглютинации. O-антиген является групповым, общим для протеолитических штаммов *C. botulinum* сероваров А, В и *C. sporogenes*; H-антиген типоспецифичен. Наблюдается совпадение его (идентичность) у бактерий, различающихся по варианту экзотоксинов.

Устойчивость. Вегетативные клетки возбудителя малоустойчивы к воздействию различных факторов внешней среды.

Температура 80°C убивает их через 30 мин, кипячение — через 2–5 мин. Резистентность спор высока. В высушенном состоянии они сохраняют жизнеспособность десятилетиями. К нагреванию споры более устойчивы в среде, содержащей значительное количество жира; наличие ионов железа, кальция, высокая концентрация сахарозы также повышают термоустойчивость.

Споры клостридий ботулизма сероваров А, В и F наиболее устойчивы к кипячению; наименее резистентны споры серовара Е. Споры сероваров С и D имеют промежуточную степень терморезистентности. Так, споры сероваров А и В хорошо переносят кипячение (100°C) в течение 5 ч и погибают только через 6 ч. При нагревании до 105°C споры погибают не ранее чем через 2 ч, при 120°C — через 20–30 мин. Поэтому более надежный способ обезвреживания спор возбудителя ботулизма — автоклавирование не менее 30 мин при 120°C. Молодые споры из 6–10-суточных культур сероваров А и В более устойчивы к температуре, чем споры из старых культур.

Споры хорошо переносят низкие температуры и не погибают при –190°C; при –16°C сохраняются до 1 года, но часть их при этом разрушается. Споры сероваров А и В обладают более высокой резистентностью к радиации: переносят облучение в дозе 2,5–3 Мрад, но эта способность у различных штаммов неодинакова и зависит от состава среды, ее рН и концентрации спор. Желудочный сок и пищеварительные ферменты их не разрушают.

Устойчивы споры и к различным химическим бактерицидным веществам. В 5%-м феноле сохраняют жизнеспособность одни сутки, 10%-й раствор соляной кислоты убивает их при комнатной температуре через 1 ч, 40%-й формалин в двукратном разведении — через 24 ч, этиловый спирт — через 2 мес. В среде, содержащей 14% поваренной соли, выживают 2 мес.

Ботулинический токсин в жидких средах разрушается при кипячении через 15–20 мин, в твердых субстратах — через 2 ч. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин) не разрушают токсины сероваров А, В, С, D, F, но усиливают активность токсина серовара Е. В кислой среде при рН 3,5–6,8 устойчивость токсинов выше, чем в щелочной, при рН 7,8 они значительно снижают свои токсические свойства, рН выше 8,5 их инактивирует.

В зерне токсин может сохраняться месяцами; солнечный свет и высушивание его ослабляют, но полностью не обезвреживают в течение 93 сут. Зерно, обработанное 1%-м раствором гидроксида натрия, теряет токсические свойства через 3–6 ч.

Патогенность. Наиболее чувствительны к ботулиническому токсину лошади, у них болезнь чаще вызывают токсины серовара В, реже — сероваров А и С. Крупный рогатый скот поражается токсинами сероваров С и D, овцы и козы также чувствительны к токсинам С и D; у коз ботулизм встречается редко, но они очень восприимчивы к токсину С. Свиньи в естественных условиях проявляют к ботулизму значительную устойчивость, однако экспериментально заболевание можно вызвать всеми сероварами токсина, причем чаще они наиболее чувствительны к сероварам В и F, но известны случаи заболевания свиней, обусловленные токсином А. Собаки, кошки, волки, другие хищники более резистентны. Исключение составляют норки, которые проявляют высокую чувствительность к ботулизму и поражаются чаще всего токсином серовара С. Описан ботулизм песцов, черно-бурых лисиц и ондатр.

К ботулизму восприимчивы более 36 видов птиц; среди них куры, индейки, утки, гуси, чайки, голуби. Болезнь вызывают преимущественно токсины сероваров С, А и В. Рыбы, амфибии и рептилии к ботулизму практически невосприимчивы.

Чувствителен к ботулизму и человек; в качестве этиологических факторов выделены клостридии сероваров А, В и Е.

Лабораторные животные (белые мыши, морские свинки и кролики) восприимчивы к ботулиническим токсинам всех сероваров.

Патогенез. Ботулинический токсин в организм попадает с кормом. Его удается обнаружить в тонком и толстом кишечниках, крови, печени, желчи, моче, иногда в мозге. Особенно сильно при ботулизме поражается центральная нервная система. Действуя на нейроны спинальных моторных центров и продолговатого мозга, вызывает развитие паралитического синдрома; поражение же периферических моторных нервно-мышечных синапсов сопровождается нарушением передачи возбуждения с нерва на мышцу. В больших дозах токсин угнетает тканевое дыхание головного мозга и выступает в качестве сосудистого яда.

Лабораторная диагностика. Биологическое исследование направлено на обнаружение ботулинических токсинов. Пробы патологического материала растирают с физиологическим раствором, затем для экстрагирования выдерживают при комнатной температуре 1–2 ч, пропускают через ватно-марлевый фильтр или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Цитратную кровь и сыворотку не разводят, но исследуют сразу после взятия: токсин в них разрушается очень быстро.

Для постановки биопробы берут четырех белых мышей массой по 16–18 г каждая. Двум из них исследуемый материал (0,5–0,8 мл) вводят внутрибрюшинно или внутривенно (в хвостовую вену). Две другие остаются контрольными, им инокулируют предварительно прогретый в течение 30 мин при 100°C экстракт. При наличии ботулинического токсина две первые мыши гибнут через 1–4 сут, контрольные остаются живы.

Типизацию токсина проводят в реакции нейтрализации с гомологичными антитоксическими сыворотками согласно прилагаемому к ним наставлению.

Иммунитет и средства специфической профилактики. При ботулизме иммунитет антитоксический. У восприимчивых животных естественный иммунитет к ботулизму отсутствует. Описаны случаи индивидуальной устойчивости к ботулиническому токсину человека и животных. Перенесенное заболевание также не вызывает иммунитета ни у человека, ни у животных.

В сыворотках здоровых людей и животных неоднократно обнаруживали в высоких титрах агглютинины к антигенам клостридий ботулизма. Эти антитела не проявляли защитного эффекта и, как предполагают, возникали в результате скрытой иммунизации малыми дозами спор, случайно попавших с пищей и кормом.

Доказана возможность создания стойкого антитоксического иммунитета к ботулизму путем искусственной вакцинации специфическим анатоксином. Для специфической профилактики ботулизма используют анатоксины, преципитированные квасцами или сорбированные на гидроксиде алюминия.

Из животных вакцинируют только норок. Они очень чувствительны к токсину серовара С и при поедании недоброкачественных кормов заболевают ботулизмом. В России вакцина против ботулизма норок представляет собой анакультуру штам-

мов серовара «С-норка», преципитированную квасцами. Вводят ее (как молодняку, так и взрослым животным) однократно в дозе 1 мл в мышцу с внутренней стороны бедра. Иммунитет наступает через 2–3 нед. после прививки и длится не менее 1 года. В США используют ассоциированную вакцину против вирусного энтерита и ботулизма норок.

Для лечебных целей выпускают антитоксическую сыворотку.

14.6.4. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭМФИЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА

Эмфизематозный карбункул (эмкар) у крупного рогатого скота вызывает *S. chauvoei*. Впервые его обнаружил Фезер в 1865 г. в подкожной клетчатке погибшей коровы. Поражаются преимущественно молодые животные. Описаны редкие случаи заболевания буйволов, овец и коз.

Эмфизематозный карбункул — острая неконтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся развитием крепитирующих отеков в массивных группах мышц, с последующим их некрозом, хромотой и быстрой гибелью животных. Распространен повсеместно во всех странах с развитым скотоводством.

Морфология. *S. chauvoei* — прямые или слегка изогнутые с закругленными концами палочки шириной 0,6–1,0 мкм и длиной 2–8 мкм. В препаратах из тканей располагаются одиночно, парами, очень редко по 3–4, нитей не образуют. Микроб обладает значительным полиморфизмом, особенно в мазках из животных тканей, где нередко приобретает форму веретена, лимона, груши, шара и др. Капсулы не имеет, подвижный (перитрих). В организме и окружающей среде образует центрально и субтерминально расположенную спору. В культуре спорообразование отмечается через 24 ч, через 48 ч становится значительным. Вегетативные клетки хорошо окрашиваются спиртоводными растворами анилиновых красок, часто воспринимают окраску неравномерно, более интенсивно на полюсах; в цитоплазме иногда обнаруживают зернистость. По Граму молодые культуры и препараты из тканей окрашиваются положительно, старые культуры — отрицательно.

Культивирование. *S. chauvoei* — строгий анаэроб, при культивировании требует создания вакуума не менее 1,06 кПа.

В МПБ и на МПА даже с добавлением глюкозы не растет. Применяют специальные среды, дополнительными ингредиентами которых являются кровь, сыворотка, кусочки печени, мозга, мышц. Наиболее часто используют среду Китта — Тароцци, бульон Мартена, мозговую среду, полужидкий агар, глюкозо-крово-аян агар, глюкозный агар с 10–12% бычьей сыворотки. Оптимальные значения рН среды 7,2–7,6; температуры — 36–38°С; рост возможен и при 14°С. В среде Китта — Тароцци уже через 12–24 ч дает пышный рост с газообразованием и легким помутнением, на 2–3 сут среда светлеет, и на дно выпадает рыхлый беловатый осадок, аналогично растет и в бульоне Мартена. Молодые культуры не пахнут, старые издают запах прогорклого масла. При росте в мозговой среде почернения не вызывают. В глубине сывороточного агара растет в форме чечевицеобразных или круглых колоний с нежными отростками. На глюкозо-кровоаном агаре Цейсслера через 24–48 ч инкубирования вырастают круглые, в виде перламутровой пуговицы, или плоские, в форме виноградного листа, с ровным краем и приподнятым центром колонии, окруженные зоной прозрачного гемолиза.

Биохимические свойства. *C. chauvoei* синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатин; свернутую сыворотку и яичный белок не разжижает; коагулирует молоко на 3–6-е сутки — сгусток имеет вид мягкой губчатой массы, пептонизация сгустка не происходит. Индол не образует, большинство штаммов продуцируют незначительное количество сероводорода, нитраты в нитриты не редуцируют. Каталазу и лецитиназу не вырабатывает. Расщепляет с образованием кислоты и газа глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, галактозу, левулезу и не разлагает маннит, салицин, глицерин, дульцит и инулин. Отношение разных штаммов к сахарам непостоянно, однако реакции на сахарозу и салицин являются индикаторными: *C. chauvoei* в отличие от *C. septicum* ферментирует сахарозу и не сбраживает салицин.

Токсикообразование. Возбудитель эмфизематозного карбункула синтезирует и выделяет экзотоксин. Образование его происходит как в организме, так и при выращивании микроба в жидких питательных средах. В составе токсина обнаружены гемотоксический и некротизирующий компоненты. *C. chauvoei* и *C. septicum* имеют общую летальную и некротизирующую фракцию токсина альфа 1, но фракция альфа 2 у токсина воз-

будителя эмкара отсутствует. Поэтому антитоксическая сыворотка *C. septicum* инактивирует гомологичный токсин и токсин *C. chauvoei*, антисыворотка же *C. chauvoei* нейтрализует только гомологичный токсин.

Возбудитель эмкара образует также патогенные ферменты: дезоксирибонуклеазу (фактор бета), гиалуронидазу (фактор гамма), токсический компонент — фактор дельта — кислородолабильный гемолизин; лецитиназу не продуцирует. Токсин обладает антигенным свойством и при обработке формалином переходит в анатоксин.

Антигенная структура. В составе антигенов возбудителя эмфизематозного карбункула выделены термостабильный соматический О-антиген и термолабильный жгутиковый Н-антиген. Они обладают видовой специфичностью и являются общими у всех штаммов. Однако имеются наблюдения, что Н-антиген *C. chauvoei*, выделяемого от крупного рогатого скота и овец, различен. Кроме того, дифференцирован споровый S-антиген, общий с *C. septicum*, что приводит к перекрестной агглютинации у этих двух видов клостридий.

Устойчивость. Вегетативная форма *C. chauvoei* малоустойчива к воздействию различных факторов окружающей среды, споры же весьма резистентны. В гниющих трупах споры сохраняются до 3 мес., в навозе с примесью крови и остатками тканей — до 6 мес., а на дне водоемов неблагоприятных территорий — свыше 10 лет, в почве — до 20–25 лет. В кислых почвах, бедных органическими веществами, споры погибают значительно раньше. При соответствующих условиях в почве могут вегетировать и размножаться. Споры *C. chauvoei* в гниющих мышцах погибают через 6 мес., в высушенных — выдерживают кипячение до 6 ч, а в свежем мясе — до 2 ч, в солонине сохраняются более 2 лет. В высушенном состоянии споры теряют жизнеспособность при 100–105°C за 2–12 мин, при 80°C — через 2 ч, но не разрушаются текучим паром на протяжении 40–50 мин. Прямые солнечные лучи убивают их через 24 ч.

На споры возбудителя губительно действует 3% -й раствор формалина в течение 10–15 мин, 3% -й фенол действует слабо. В 6% -м растворе гидроксида натрия они погибают через 6–7 сут, в 12% -м растворе — через 24 ч и в 25% -м — через 14 ч, но в подогретом до 40°C — через 50 мин.

Растворимый токсин, синтезируемый микробом при росте в жидких средах, разрушается при 60°C в течение 4 ч; токсин, связанный с бактериальными клетками, более резистентный; температура не разрушает его.

Патогенность. В естественных условиях преимущественно болеют крупный рогатый скот и овцы. Редкие случаи заболевания наблюдают у коз, буйволов, оленей и лосей. *S. chauvoei* был также выделен из трупов норок как возбудитель кормового отравления. Наиболее восприимчив молодой крупного рогатого скота в возрасте от 3 мес до 4 лет. Животные старше 4 лет резистентны за счет иммунизирующей субинфекции, телята — благодаря колостральному иммунитету. Однако изредка отмечались случаи заболевания телят 3-суточного возраста и скота в возрасте 10–12 лет. Племенные животные, особенно мясных пород, более восприимчивы, чем степной и рабочий скот. Независимо от породы повышенной чувствительностью обладают упитанные животные: их мышечная ткань содержит больше гликогена, необходимого для развития микроба.

Лошади и ослы невосприимчивы, отмечают отдельные случаи болезни у свиней. Верблюды в естественных условиях не болеют. Собаки и кошки невосприимчивы. Человек к возбудителю эмфизематозного карбункула также невосприимчив.

Из лабораторных животных наиболее чувствительны морские свинки, которые гибнут спустя 16–48 ч после заражения.

Патогенез. Заражение происходит при попадании спор в пищеварительный тракт с кормом и питьевой водой, чему благоприятствуют травмы слизистой оболочки, в том числе и микротравмы. Личинки оводов, мигрируя из пищеварительного канала в мышцы, способствуют внедрению возбудителя эмфизематозного карбункула и создают условия для его размножения. Возбудитель может проникать в организм также через ранки на поверхности тела, особенно вызванные укусом кровососущих насекомых. Иногда отмечают локализацию процесса в грудной полости, что указывает на возможность пылевого заражения через органы дыхания. С током крови возбудитель попадает в мышцы и области воспаления, наиболее благоприятные для его развития, — гематомы, размозженные и разорванные ткани, участки некроза. Первичный очаг инфекционного процесса возникает после короткого инкубационного пе-

риода и имеет тенденцию к бурному развитию. В местах оседания микробы интенсивно размножаются, выделяют токсин и образуют газ.

Компоненты токсина подавляют фагоцитоз, вызывают нарушение целостности кровеносных сосудов и другие повреждения, ведущие к отеку и некрозу тканей, газы же обуславливают крепитацию образовавшихся отечных припухлостей.

Продукты распада тканей и токсины возбудителя служат причинами развития лихорадки, нарушения сердечной деятельности и расстройств дыхания. Перед гибелью животных резко повышается концентрация микробов в тканях и отмечается бактериемия. Инфекционный процесс может протекать и без образования карбункула — в виде сепсиса.

Лабораторная диагностика. Патологическим материалом для лабораторного диагноза служат кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного. Необходимо помнить, что запрещено вскрытие трупов животных, погибших от эмфизематозного карбункула (почвенная инфекция). Кусочки мышц отбирают без полного вскрытия трупа, если же труп случайно вскрыт, берут кусочки паренхиматозных органов.

Исследование проводят по схеме: микроскопия мазков, посевы на питательные среды в анаэробных и аэробных условиях и заражение лабораторных животных.

Микроскопия имеет ориентировочное значение. Мазки окрашивают по Граму и Муромцеву. *S. chauvoei* — грамположительная, полиморфная, спорообразующая, толстая с закругленными краями палочка. Бактерии располагаются одиночно или парами.

Чистую культуру *S. chauvoei* удастся выделить, если посевы делают сразу же после гибели животного. Но, как правило, материал бывает сильно загрязнен посторонней микрофлорой, поэтому применяют ряд методов подавления сопутствующей микрофлоры. Материал можно высушить в термостате, при этом вегетативные клетки гибнут, а споры сохраняют жизнеспособность. Рекомендуют также проводить посев в жидкую элективную среду с добавлением фенола, кристаллвиолета или азида натрия, которые ингибируют постороннюю микрофлору. Иногда материал прогревают при 80°C в течение 15 мин. Исследуемый материал засевают пастеровской пипеткой в среду Китта —

Тароцци, в МПБ, на МПА и глюкозо-кровоной агар в чашках (агар Цейсслера). Посевы инкубируют в анаэробных условиях при 37°C в течение 24–48 ч. Со среды Кита — Тароцци для выделения чистой культуры делают дробный посев на чашки с глюкозо-кровоным агаром. Наличие характерных колоний на агаре и типичных по морфологии палочек в препаратах из колоний дает основание для постановки предварительного диагноза.

В необходимых случаях изучают сахаролитические и протеолитические свойства культуры. Для окончательного диагноза необходима биопроба.

Вирулентностью обладают только свежeweыделенные культуры.

Иммунитет и средства специфической профилактики.
У крупного рогатого скота и овец естественный иммунитет отсутствует, но с возрастом восприимчивость их к данной инфекции снижается. В результате переболевания животные приобретают длительный активный иммунитет. По своей природе иммунитет при эмфизематозном карбункуле антитоксический и антимикробный.

Для иммунизации используют концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец. Иммунитет после прививки наступает через 14 сут и продолжается до 6 мес, но она не защищает от возбудителей злокачественного отека.

Применяют также живую вакцину из штамма 2/14, которая безвредна для крупного рогатого скота и обеспечивает формирование иммунитета через 4–5 сут, продолжительностью более 12 мес.

Иммунную сыворотку против эмфизематозного карбункула, обладающую профилактическим и терапевтическим действиями, получают путем иммунизации молодняка крупного рогатого скота, а также жеребят.

14.6.5. ВОЗБУДИТЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ОТЕКА

Злокачественный отек (газовая инфекция, раневой газовый отек, газовая гангрена) — острая неконтагиозная раневая инфекция, вызываемая группой патогенных клостридий. Характеризуется быстро распространяющимся болезненным отеком

мягких тканей, их разрушением, образованием в пораженных тканях газа и интоксикацией организма.

Встречается в виде спорадических случаев повсеместно. Обычно болезнь развивается после обширных и глубоко проникающих ранений. Поражает животных и человека. У крупного рогатого скота злокачественный отек может наблюдаться после отелов, особенно тяжелых, сопровождающихся повреждениями и ранениями родовых путей, а также после абортот.

Злокачественный отек — заболевание полимикробной этиологии. В развитии инфекционного процесса основную роль играют следующие виды бактерий из рода *Clostridium*: *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. histolyticum* и *C. sordellii*.

У сельскохозяйственных животных возбудителем болезни чаще является *C. septicum*, нередко наблюдается смешанная инфекция. В пораженных тканях иногда обнаруживают протейную бактерию *C. sporogenes*, которая способствует гнилому распаду тканей, в результате чего осложняется течение болезни.

CLOSTRIDIUM SEPTICUM (VIBRION SEPTIQUE)

Clostridium septicum (*Vibrion septique*) — анаэробная бактерия, выделена из трупа коровы в 1877 г. Пастером и Жубертом.

Морфология. *C. septicum* — полиморфная, грамположительная, бескапсульная, подвижная палочка (перитрих) длиной 2–10 мкм и шириной 0,8–2 мкм. Споры овальной формы, располагаются центрально или субтерминально, образуются в культурах и трупе. В мазках из культур находят отдельные палочки, цепочки и нити. Микробные клетки из старых культур граммотрицательные и плохо окрашиваются спиртово-водными растворами анилиновых красителей. В препаратах-отпечатках из серозных покровов печени и других органов обнаруживают длинные нити.

Культивирование. *C. septicum* строгий анаэроб. Оптимальная температура 37°C, pH 7,6. В среде Китта — Тароцци растет интенсивно, вызывая через 16–24 ч равномерное помутнение среды с газообразованием. Через 48 ч микробы оседают на дно, и бульон просветляется. При росте в мозговой среде почернения не наступает, но образуется газ. В агаре столбиком растет в

виде нежных хлопьеподобных колоний диаметром 1–2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими переплетенными нитями, а на поверхности кровяного агара с глюкозой — в виде кружевных сплетений нитей-арабесок с зоной гемолиза.

Молоко свертывается медленно (через 3–5 сут), пептонизация сгустка казеина не происходит.

Биохимические свойства. Ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу, левулезу и салицин, не разлагает глицерин и маннит. Очень редко разлагает сахарозу.

Токсинообразование. *C. septicum* синтезирует сложный высокоактивный экзотоксин. Токсин может быть выделен из фильтрата культур на бульоне Мартена (рН 7,6–7,8), на средах из кислотного и ферментативного гидролизата казеина.

В составе токсина обнаруживают четыре растворимых компонента: α , β , γ и δ . α -токсин — летальный, некротический и гемолитический фактор, скорее всего фермент, не относящийся к лецитиназам, гемолизирует эритроциты овцы в течение 60 мин в растворе без сахарозы. β -токсин — кислородолабильный гемолизин, представляет собой фермент дезоксирибонуклеазу; вызывает быстрый гемолиз эритроцитов; нейтрализуется антисывороткой *C. perfringens*. γ -токсин — фермент гиалуронидаза. δ -токсин — гемолизин, лизирующий эритроциты барана, лошади и человека. В культуральных фильтрах *C. septicum* кроме токсических компонентов обнаружены также фибринолизин и коллагеназа, которые усугубляют деструктивные процессы при газовой гангрене.

Антигенная структура. У *C. septicum* выделены О- и Н-антигены. Установлена общность споровых антигенов у *C. septicum* и *C. chauvoei*, но их четко дифференцируют по О-антигену. С помощью Н-агглютинации внутри вида *C. septicum* выявлено 6 сероваров.

Устойчивость. Vegetативные формы микроба быстро гибнут под влиянием различных факторов окружающей среды; довольно чувствительны к кислороду. Споры относительно устойчивы. В почве возбудитель может вегетировать и сохраняться годами.

Патогенность. Вызывает газовую гангрену у животных и человека, а также брэдзот овец. К заражению чувствительны

лошади, крупный рогатый скот, овцы, свиньи. Патогенен для всех лабораторных животных, но в основном для биопробы используют морских свинок. Животные, зараженные подкожно или внутримышечно, погибают через 8–20 ч с признаками газового отека. На месте инъекции у них легко снимается шерсть, происходит выпотевание красноватой жидкости. При вскрытии кожа легко отделяется, подкожный слой красного цвета, мышцы отечны, геморрагично инфильтрированы и пропитаны пузырьками газа. В грудной и брюшной полостях скапливается значительное количество жидкости. Кишечник вздут.

Культуру легко выделить из крови сердца и из печени.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (*C. welchii*)

Открыли и описали в 1892 г. М. Уэлч и Г. Неттал. Широко распространен в природе и встречается повсеместно, особенно часто его обнаруживают в почве, богатой гумусом. Патогенные штаммы микроба выделяют из почвы, загрязненной фекалиями животных. Основной резервуар патогенных штаммов — здоровые животные, в желудочно-кишечном тракте которых *C. perfringens* размножается и выделяется с фекалиями в окружающую среду. Так происходит загрязнение кормов, пастбищ, почвы — вначале вегетативными формами, а затем спорами: микроб быстро спорулирует и длительное время сохраняется.

C. perfringens — самый нетребовательный анаэроб, очень активный в биохимическом отношении и весьма патогенный.

Морфология. *C. perfringens* всех шести сероваров — неподвижные, без жгутиков, с закругленными концами, довольно толстые палочки длиной 4–8 и шириной 0,6–1,5 мкм. Под воздействием различных факторов (антибиотики, состав среды и др.) форма бактерий сильно изменяется: в культуре наряду с типичными клетками обнаруживают короткие толстые палочки, иногда кокковидной формы, или же длинные нити до 100–145 мкм. Палочки нередко бывают изогнутыми.

В организме животных микроб образует капсулу, окружающую тело микроба светлым ободком, хорошо видимым при окраске простым способом. У вирулентных штаммов капсула шире и они более резистентны к фагоцитозу. Капсула сохраняется при выращивании культур на питательных средах, содержащих

нативный белок. При длительном хранении или после частых пересевов на среды, бедные нативным белком, способность к образованию капсулы утрачивается.

При выращивании на щелочных средах, богатых белками и не содержащих углеводов, бактерии образуют крупные овальные центральные или субтерминальные споры.

Хорошо красится основными красками. В культурах грамположительная.

Культивирование. *S. perfringens* не относится к строгим анаэробам. В среде Китта — Тароцци дает равномерную муть и газообразование уже через 3–4 ч после посева. Газообразование происходит за счет сбраживания глюкозы и изомальтозы при расщеплении гликогена мышц или печени, находящихся в среде. Через 3–5 сут среда просветляется, и на дно выпадает обильный белый осадок. Культура издает запах масляной кислоты. Рост также можно получить на простом бульоне с глюкозой. При росте на кровяном агаре через 12–18 ч образуются мелкие (до 2–4 мм) колонии, окруженные обширной зоной гемолиза, которые под влиянием кислорода приобретают оливковый или зеленоватый цвет. Колонии круглые, сочные, куполообразные, с гладкой блестящей поверхностью и ровным краем.

На молоке через 8–10 ч появляется плотный губчатый сгусток, часто приподнятый газом до пробки, молочная сыворотка прозрачная. При росте на среде Вильсона — Блера в результате восстановления железа уже через 6–8 ч вырастают черные колонии в толще среды, так как среду заливали после посева слоем МПА для создания анаэробных условий. При этом в чашке отмечается сильное газообразование. Мозговая среда не чернеет.

Биохимические свойства. *S. perfringens* обладает протеолитическими свойствами. Свернутую сыворотку и вареные кусочки мяса разжижает медленно — на 2–7-е сутки. Однако у большинства штаммов серовара А протеолитическая активность выражена в значительной степени за счет ферментов, расплавляющих через 24 ч желатин. Характерное свойство для *S. perfringens* — способность свертывать лакмусовое молоко с образованием сгустка кирпичного цвета и полным просветлением молочной сыворотки. Все штаммы сбраживают с образо-

ванием кислоты и газа глюкозу, галактозу, мальтозу, лактозу, левулезу, сахарозу и не ферментируют маннит и дульцит. Некоторые штаммы могут разлагать глицерин и инулин.

Токсинообразование. *C. perfringens* вырабатывает сложный экзотоксин, образующий свыше 15 токсических факторов.

К основным токсическим факторам относят следующие: α -токсин — фосфолипаза (лецитиназа С) — один из главных факторов, обладающий летальным, некротическим, гемолитическим и цитопатогенным действиями; β -токсин — летальный некротический фактор; γ -токсин — летальный, не обладающий гемолитической активностью, фактор; δ -токсин — летальный и гемолитический яд; ε -токсин — летальный некротический протоксин, активирующийся трипсином; τ -токсин обладает резко выраженными гемолитическими и в слабой степени летальными и некротическими свойствами; i -токсин — летальный, некротический протоксин, активирующийся трипсином; k -токсин представлен коллагеназой, действующей на нативный коллаген; λ -токсин — желатиназа, действующая на денатурированный коллаген и желатин; μ -токсин — гиалуронидаза; ν -токсин — дезоксирибонуклеаза.

В составе экзобелков возбудителя обнаружены нейраминидазный и плазмокоагулазный компоненты, а также фибринолитический фермент. Сложный состав экзопродуктов бактерий этого вида определяет его разностороннее действие и спектр патогенности.

Антигенная структура. На основании антигенного состава токсических факторов различают шесть сероваров *C. perfringens*: А, В, С, D, Е и F.

Серовар А (*C. welchii*) вызывает газовую гангрену (злокачественный отек) у людей и животных, а штаммы, образующие энтеротоксин, — пищевые токсикоинфекции. Вызывает энтеротоксемию телят и поросят, а также некротический мастит овец, коз и крупного рогатого скота. Синтезирует α -, τ - и k -токсины.

Серовар В (*Lamb dysentery bacillus*) вызывает анаэробную дизентерию (некротический энтерит) ягнят, козлят, телят, поросят, жеребят и цыплят. В числе токсических компонентов обнаруживают α -, β -, ε -токсины, а также протеиназу и гиалуронидазу.

Серовар С (*B. paludis*) вызывает геморрагическую энтеротоксемию овец, иногда энтеротоксемию телят, ягнят, поросят, коз и верблюдов. Синтезирует α - и β -токсины.

Серовар D (*B. ovitoxicus*) — возбудитель энтеротоксемии овец («мягкая почка»), выделяют также при энтеротоксемии коз, телят и при «травяной болезни» у лошадей. Синтезирует α - и ϵ -токсины.

Серовар E (*C. perfringens* typ E) выделяют при энтеротоксемии телят и ягнят. Синтезирует α - и ι -токсины, а также активные коллагеназу и протеиназу.

Серовар F (*B. enterotoxigenus*) описан как возбудитель некротического энтерита людей, выделяет α - и β -токсины.

Устойчивость. Вегетативные клетки малоустойчивы, резистентность же спор, напротив, очень высокая. Споры различных штаммов серовара А выдерживают нагревание при 100°C в течение 1–3 ч.

Патогенность. Все серовары *C. perfringens* способны вызывать газовую гангрену у человека и животных. Отдельные варианты являются возбудителями специфических инфекционных болезней у животных различных видов: анаэробной дизентерии ягнят, энтеротоксемии овец, телят и др.

В экспериментальных условиях весьма чувствительны к заражению голуби, воробьи, морские свинки, более устойчивы кролики, белые мыши, крысы.

CLOSTRIDIUM NOVUM (*C. oedematiens*)

Выделил Ф. Нови в 1883 г. из трупа морской свинки. Этиологическую роль этого вида бактерий как возбудителя газовой гангрены установили в 1915 г. М. Вейнберг и К. Сеген.

Морфология. Крупная полиморфная прямая или слегка изогнутая с закругленными, иногда обрубленными краями палочка длиной 4–8 и шириной 1–1,5 мкм; бактерии составляют короткие цепочки из 3–5 клеток и более. Капсул не образует. В молодых культурах палочки подвижны (перитрихи), в присутствии кислорода подвижность быстро теряется. Образует круглые или овальные субтерминальные споры, которые обычно обнаруживаются через 24 ч роста культуры. Хорошо окрашиваются спиртово-водными растворами обычных анилиновых

красок. Молодые вегетативные клетки грамположительные, в старых культурах — грамтрицательные.

Культивирование. *S. novyi* — один из строгих анаэробов. Оптимальная температура 37°C, рН 7,8. В среде Китта — Тароцци дает обильный рост с помутнением среды и слабым газообразованием. Культуры издают неприятный запах. Время инкубирования — около 48 ч. В дальнейшем бульон просветляется и на дне образуется хлопьевидный осадок. На кровяном агаре с глюкозой растет в виде шероховатых серого цвета колоний с неправильными бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии колоний переплетенные нити. Колонии окружены зоной гемолиза. В глубине столбика агара с глюкозой колонии имеют форму чечевицы, комочков ваты, хлопьев, часто с желтоватым или коричневатым центром. Через 36–48 ч с момента посева можно наблюдать разрыв агара за счет образования газов.

Мозговая среда не чернеет. Молоко свертывается медленно, с выпадением мелких сгустков, пептонизация их не наступает.

Биохимические свойства. Сахаролитические свойства выражены слабо и различны у отдельных сероваров. *S. novyi* сероваров А, В, и С ферментирует глюкозу, фруктозу и мальтозу, а серовар D — только глюкозу; глицерин разлагают все серовары, кроме некоторых штаммов серовара В. Способность разлагать углеводы неоднозначна (в зависимости от штамма). Протеолитические свойства выражены слабо.

Токсинообразование. *S. novyi* в организме и при росте на элективных питательных средах синтезирует и выделяет очень активный и сложный токсин из восьми компонентов. К числу более изученных относят α -, β -, γ - и δ -токсины. α -токсин — термолабильный, летальный, некротический, капиллярный яд; вызывает некроз тканей, их отек и гибель животных. β -токсин — фосфолипаза С (лецитиназа) обладает некротическим, гемолитическим и летальным действием. γ -токсин — фосфолипаза D; некротизирующий и гемолитический токсин. δ -токсин — кислородолабильный.

Экзотоксин *S. novyi* по активности превосходит токсины других возбудителей газовой гангрены: сильнее угнетает фагоцитоз и обладает гемолитическим действием, которое нейтрализуется

специфической антитоксической сывороткой, ему присущи летальные и некротические свойства. Токсин разрушается при нагревании до 50°C в течение 30 мин.

Микроб также образует патогенные ферменты — гиалуронидазу, фибринолизин, дезоксирибонуклеазу, протеиназы.

Антигенная структура. По составу растворимых антигенов токсина различают четыре серовара *C. novyi*: А, В, С и D.

Серовар А (*C. novyi*) вызывает газовую гангрену у человека и животных, выделяют также при бродзоте. Вырабатывает α -, γ - и δ -токсины.

Серовар В (*C. gigas*) вызывает инфекционный некротический гепатит овец, а также газовую гангрену человека и травоядных; у крупного рогатого скота и свиней — инфекционный некротический гепатит. Вырабатывает α - и β -токсины.

Серовар С (*C. bubalorum*) вызывает хронический остеомиелит у буйволов, продуцирует γ -токсин.

Серовар D (*C. haemolyticum*) вызывает инфекционную иктерогемоглобинурию у крупного рогатого скота, очень редко — у овец и в единичных случаях — у свиней. Синтезирует β -токсин, а также η - и θ -токсины. Первый из них — фермент тропомиозинаяза. Расщепляет миозин и повреждает мышцы.

Устойчивость. Vegetативные формы по устойчивости не отличаются от других видов патогенных анаэробов. Погибают от воздействия прямых солнечных лучей через 24–48 ч, ультрафиолетового излучения — через 20–30 мин. Нагревание до 80°C убивает их за 20 мин, кипячение — за 5 мин. Споры сохраняются в почве в течение 7–8 лет и выдерживают кипячение 1–2 ч.

Патогенность. Злокачественный отек, обусловленный *C. novyi*, может возникать вследствие любого глубокого ранения, инфицированного этим возбудителем. Исход болезни, как правило, смертельный. Поражаются животные различных видов: лошади и другие непарнокопытные, крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, дикие млекопитающие, птицы.

Из лабораторных животных наиболее восприимчивы морские свинки. У них на месте введения культуры развивается желатинообразный студенистый бесцветный или розоватый отек с небольшим количеством газа. Мышцы гиперемированы, без запаха.

CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM

Выделили в 1916 г. Вейнберг и Сеген из раневого содержимого человека, пораженного газовой гангреной. При раневой анаэробной инфекции *C. histolyticum*, как правило, встречается реже других. Обнаруживают микробов и в сочетании с другими патогенными клостридиями, что значительно осложняет течение болезни. У лошадей известны случаи, когда *C. histolyticum* был единственным возбудителем раневой инфекции. Этот микроб является довольно часто естественным обитателем кишечника человека и животных.

Морфология. *C. histolyticum* — грамположительная палочка длиной 3–5 и шириной 0,2–0,5 мкм, образующая в старых культурах овальные, расположенные центрально или субтерминально (в виде игольного ушка) споры; в организме споры не формируются. Перитрих, подвижный в свежих культурах. Капсулы не имеет. Легко окрашивается спиртово-водными растворами анилиновых красок.

Культивирование. В среде Китта — Тароцци растет без газообразования; дает равномерное помутнение с последующим просветлением среды и образованием осадка. При росте на агаре с кровью через 24–48 ч появляются мелкие росинчатые колонии диаметром 0,5–1,0 мм; полусферические, прозрачные, блестящие, с ровным краем и узкой зоной гемолиза вокруг, но чаще гемолиз отсутствует. Старые колонии теряют прозрачность, становятся серыми или серовато-белыми с неровными краями. В глубине сахарного агара с высоким столбиком штаммы, обладающие подвижностью, образуют колонии-пушинки, а неподвижные штаммы — колонии-чечевицы, иногда с отростками. На мозговой среде на 2–3-е сутки роста начинается почернение, максимум которого наступает на 7–9-е сутки.

Биохимические свойства. Микроорганизм не ферментирует ни один из сахаров. Только некоторые штаммы сбраживают глюкозу без кислоты. Обладает высокой протеолитической активностью. Кусочки нативных мышц, помещенные в жидкую питательную среду с интенсивно растущей культурой *C. histolyticum*, подвергаются быстрому протеолизу. Индол не образуют, сероводород в культурах выделяется в значительном количестве.

Токсинообразование. В жидких средах *C. histolyticum* образует сложный термолабильный токсин из пяти компонентов.

α -токсин — летальный, некротический яд, поражающий центральную нервную систему: при внутривенном его введении гибель животных сопровождается судорогами и конвульсиями. β -токсин — коллагеназа, разрушает нативный и денатурированный коллаген, а также желатин. γ -токсин — протеиназа, активируется цистеином, разрушает желатин и казеин, на коллаген не действует. δ -токсин — эластаза, протеолитический фермент. ε -токсин — гемолизин, чувствителен к действию кислорода. *C. histolyticum* синтезирует также дезоксирибонуклеазу. Среди токсических компонентов этого микроба преобладают протеолитические ферменты.

Антигенная структура. Антигены β -, γ - и δ -токсинов различны и нейтрализуются только гомологическими антисыворотками.

Устойчивость. У *C. histolyticum* она сравнима с другими патогенными анаэробами — возбудителями газовой гангрены. Однако устойчивость спор может меняться в зависимости от штамма, но обычно они погибают при кипячении в течение 1 ч.

Патогенность. Самостоятельно вызванная этим микроорганизмом инфекция встречается исключительно редко. Патогенными бывают только штаммы S-форм.

Газовая гангрена с участием *C. histolyticum* протекает тяжело, с явлениями быстрого глубокого распада мягких тканей, и часто заканчивается смертью. При внутримышечной инъекции 0,5–1,0 мл свежей культуры или токсина в конечность морской свинки отмечают покраснение кожи, отек, множественные кровоизлияния, расплавление мышечной и соединительной тканей. На месте введения образуется язва, затем расплавление мягких тканей до костей. Гибель наступает через 18–28 ч, газ и запах отсутствуют.

В расплавленных мышцах и перитонеальной жидкости обнаруживаются бактерии. В качестве посевного материала для выделения культуры лучше всего использовать ткани из места заражения.

CLOSTRIDIUM SORDELLII

Выделил Сорделли в 1922 г. у больного газовой гангреной человека. Этот микроб рассценивают как патогенный вариант *C. bifementans* серовара В.

Морфология. *C. sordellii* — полиморфные палочки с закругленными концами длиной 3–8 и шириной 1,2–1,5 мкм. Бактерии располагаются изолированно и по 2–3 клетки, редко цепочками. Образует овальные, центральные или субтерминальные споры, обнаруживаемые в культурах. Имеет жгутики: перитрих, наиболее подвижен в молодых культурах. Капсулу не синтезирует. По Граму окрашивается положительно.

Культивирование. Строгий анаэроб. В среде Китта — Тароцци в течение 24 ч образует интенсивное помутнение и газ, в старых культурах часто отмечается тягучая слизь. Культуры издают неприятный гнилостный запах. На кровяном агаре Цейсслера через 24–48 ч появляются слабовыпуклые серовато-белые колонии с неровными краями, окруженные узкой зоной гемолиза. В глубине столбика агара колонии имеют форму чевицы, иногда с выростами по краю.

Биохимические свойства. Ферментирует глюкозу, мальтозу, фруктозу и не расщепляет лактозу и сахарозу. Синтезирует протеазы. Молоко пептонизирует, разжижает желатин и свернутую сыворотку, переваривает мышечную ткань и яичный белок. Вырабатывает аммиак и сероводород. Индола не образует, нитраты в нитриты не восстанавливает.

Токсинообразование. Вирулентные штаммы *C. sordellii* вырабатывают высокоактивный термолабильный летальный некротический токсин, вызывающий желатинообразный отек (разрушается при 60°C). Этот токсин напоминает α -токсин *C. novyi* и нейтрализуется специфической антисывороткой. Синтезирует лецитиназу С, лизирующую эритроциты мышей, в меньшей степени — кролика и почти не действует на эритроциты овец. Имеет общие антигенные субстанции с лецитиназой *C. perfringens* А. Вырабатывает гиалуронидазу и кислотолабильный гемолизин типа тета-токсина *C. perfringens*. Ферментами патогенности у этого микроба также служат уреаза и фибринолизин.

Патогенность. Микроб обнаруживают у крупного рогатого скота при анаэробной энтеротоксемии, а также при браздоте.

К экспериментальному заражению чувствительны морские свинки, кролики, мыши, кошки и голуби. 48-часовая бульонная культура при внутримышечном и подкожном введениях вызывает гибель животных через 24 ч. В месте введения заражающего

материала развивается подкожный желатинообразный бесцветный или розово-красного цвета отек. Иногда выделяются пузырьки газа; гнилостный запах отсутствует. Слизистая кишечника и желудка геморрагична.

В *патогенезе* газовой инфекции различают две фазы — инфекционную и токсическую. Первая характеризуется интенсивным размножением микроорганизмов в очаге поражения и быстрым распространением их по всем тканям и органам; уже через час микробы обнаруживают в мышцах и во внутренних органах. Вторая возникает в результате действия токсинов, всосавшихся в ткани, и характеризуется появлением в них соответствующих изменений. Динамика патологического процесса прежде всего определяется составом токсических компонентов, синтезируемых клостридиями. Выхожение плазмы и форменных элементов крови из сосудов в окружающие ткани приводит к развитию отека. Из-за наличия в отечной жидкости токсинов, обладающих некротизирующими и протеолитическими свойствами, разрушаются соединительная и мышечная ткани, одновременно в очаге поражения происходит интенсивное газообразование как результат ферментативного действия клостридий. Сложные деструктивные изменения тканей (протеолиз и некроз) создают благоприятные условия для быстрого размножения клостридий и накопления токсина. Параллельно угнетается фагоцитарная активность лейкоцитов и макрофагов. В результате интоксикации поражаются центральная нервная система, дыхательный центр, нарушается сердечная деятельность и наступает смерть.

Лабораторная диагностика. Материалом для бактериологического исследования при злокачественном отеке служат тканевый экссудат, кусочки пораженных мышц, паренхиматозные органы, а от трупов овец, кроме того, часть сычуга и тонкого кишечника с содержимым (для одновременного исследования на бродзот и энтеротоксемию). При исследовании проводят микроскопию мазков, посевы на питательные среды, заражение лабораторных животных.

Мазки окрашивают по Граму и Муромцеву. Наличие в препаратах большого количества крупных грамположительных палочек служит ориентировочным признаком при подозрении на клостридиальную инфекцию.

Свежий материал пастеровской пипеткой засевают в среду Китта — Тароцци, а также в МПБ и на МПА. Если материал несвежий, то готовят суспензию в физиологическом растворе, прогревают ее 15–20 мин при 80°C с целью разрушения вегетативных клеток сопутствующих бактерий и проводят высевы. Одновременно материал засевают на глюкозо-кровяной агар в чашках. Посевы инкубируют в анаэробных условиях 16–48 ч, после чего изучают рост в среде Китта — Тароцци и на глюкозо-кровяном агаре. Устанавливают морфологию и подвижность бактерий из культур в среде Китта — Тароцци.

Для выделения чистой культуры с жидкой питательной среды делают дробные посевы на чашки с глюкозо-кровяным агаром. Наличие характерных колоний и крупных грамположительных палочек в мазках служит основанием для постановки предварительного микробиологического диагноза. В ряде случаев возникает необходимость изучить биохимические показатели выделенной культуры. Сахаролитические свойства определяют путем посевов в полужидкий агар с углеводами и индикатором, протеолитические — посевами на молоко, мозговую среду, желатин и свернутую сыворотку.

Диагноз подтверждают биологическим исследованием. С этой целью проводят подкожное или внутримышечное заражение морских свинок взвесью из патологического материала в дозе 1 мл и наблюдают за ними 7–8 сут. При наличии возбудителей злокачественного отека животные погибают через 16–48 ч с характерными патологоанатомическими изменениями, вызываемыми определенным видом анаэроба.

Для определения вида и серовара возбудителя применяют реакцию нейтрализации с гомологичными антитоксическими сыворотками.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при злокачественном отеке антитоксический.

В связи со спорадичностью, полимикробностью этиологии и быстрым течением болезни активная профилактика злокачественного отека не нашла практического применения. При угрозе инфицирования травматических повреждений рекомендуется пассивная иммунопрофилактика поливалентной антитоксической сывороткой, а также применение антибиотиков широкого спектра и пролонгированного действия.

14.6.6. ВОЗБУДИТЕЛЬ БРАДЗОТА ОВЕЦ

Брадзот — острая неконтагиозная болезнь овец, характеризующаяся геморрагическим воспалением сычуга и двенадцатиперстной кишки (отек, геморрагии, иногда некрозы) с образованием газа в пищеварительном тракте. Болезнь заканчивается гибелью животного. Распространена во всех странах, где развито овцеводство. Источник инфекции — больные овцы. Описаны случаи заболевания брадзотом коз и свиней. Возбудитель — *C. septicum*.

В лабораторию для бактериологического исследования направляют перевязанную часть сычуга и двенадцатиперстной кишки с содержимым, паренхиматозные органы, мышцы, отечную ткань, трубчатую кость. Пригоден только свежий материал, так как у овец после гибели в кишечнике происходит быстрое размножение анаэробных бактерий и проникновение их в органы и ткани; результаты исследования материала от несвежих трупов не учитывают. Схема микробиологического диагноза аналогична схеме при злокачественном отеке.

Для профилактики брадзота применяют поливалентную концентрированную гидроокисьалюминиевую вакцину против брадзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, а также анатоксин поливалентный против клостридиоза овец (полианатоксин).

14.6.7. ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ

Заболевание характеризуется общей токсемией и бактериемией. Болеют все виды сельскохозяйственных животных. Встречаются: анаэробная дизентерия ягнят; инфекционная энтеротоксемия овец; анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота и др.

Анаэробная дизентерия ягнят — острая токсикоинфекция, поражающая новорожденных ягнят в первые пять дней жизни. Болезнь характеризуется геморрагической энтеротоксемией и сопровождается высокой смертностью. Вызывается сероваром *V. C. perfringens* (*Lamb dysentery bacillus*).

Материалом для лабораторного исследования служат свежий труп или перевязанный отрезок пораженного кишечника,

трубчатая кость и стерильно взятое содержимое тонкого кишечника.

Лабораторный диагноз ставят на основании данных обнаружения токсина в содержимом тонкого кишечника при помощи биопробы на белых мышах или кроликах.

При обнаружении токсина в фильтрате содержимого кишечника определяют его серовар в реакции нейтрализации на белых мышах с антитоксическими сыворотками *C. perfringens*.

В настоящее время для профилактики дизентерии ягнят применяют вакцину и полианатоксин (см. бродзот овец). В неблагополучных хозяйствах вакцинируют суягных маток, так как после рождения ягнота с молозивом получают материнские антитела. Кроме вакцин используют антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец. С профилактической целью ягнятам через 1–2 ч после рождения вводят сыворотку подкожно в дозе 50–100 ИЕ, при лечении — внутримышечно или внутривенно в дозе 100–200 ИЕ.

Инфекционная энтеротоксемия овец (болезнь «мягкая почка») — заболевание овец всех возрастов, развивающееся в результате всасывания из кишечника токсинов, синтезируемых возбудителем. Болезнь может протекать молниеносно, остро и хронически. При молниеносном течении болезнь возникает внезапно, и животные гибнут быстро. При вскрытии животных через несколько часов после их гибели обнаруживают характерное размягчение одной или двух почек.

Возбудитель — серовар *D. C. pefringens* (*B. ovitoxicus*), реже — серовар С. Основным токсическим фактором серовара D служит ε-токсин.

Встречается болезнь повсеместно. Переболевшие и оставшиеся живыми овцы приобретают иммунитет продолжительностью 7–10 мес.

Для активной профилактики применяют полианатоксин и поливалентную вакцину. С целью пассивной иммунизации и специфического лечения используют антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец. Сыворотку получают из крови крупного рогатого скота, гипериммунизированного анакультурами и токсинами *C. perfringens* сероваров В, С и D.

Анаэробная энтеротоксемия — остропротекающая тяжелая болезнь телят, характеризующаяся геморрагическим энтеритом, часто — кровоизлияниями на слизистых оболочках носовой и ротовой полостей, выраженной токсемией. В основном болеют новорожденные, но встречается и у телят до 1,5–2-месячного возраста. Возникает болезнь спонтанно, без занесения из других хозяйств. Основным резервуаром обитания возбудителей служит желудочно-кишечный тракт животных, в котором они размножаются и выделяются с фекалиями во внешнюю среду. Энтеротоксемия встречается практически во всех странах с развитым животноводством.

Возбудителями энтеротоксемии крупного рогатого скота являются серовары А, В, С, D и E *C. perfringens*. Особую опасность представляет серовар А, так как вызывает тяжело протекающую болезнь и массовую гибель телят. Заболевание может быть вызвано каждым сероваром отдельно; обнаружены также случаи смешанной инфекции, обусловленной сероварами А, В, С и D. Серовары С и D обычно вызывают болезнь у телят более старшего возраста.

Микробиологический диагноз включает обнаружение токсина в содержимом кишечника и определение его токсичности. При обнаружении токсина ставят реакцию нейтрализации с антитоксическими сыворотками сероваров А, В, С, D и E на белых мышах.

Для специфической профилактики используют антитоксическую сыворотку против дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец.

14.7. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ ПАЛОЧКИ, НЕ ОБРАЗУЮЩИЕ СПОРЫ

14.7.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕКРОБАКТЕРИОЗА

Некробактериоз (*Necrobacteriosis*) — инфекционная болезнь многих видов домашних и диких млекопитающих животных, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями кожи, слизистой оболочки, внутренних органов и конечностей.

Болезнь известна давно; описывалась под названиями копытная болезнь, парша губ, энзоотический стоматит ягнят, дифтерия телят, гангренозный мокрец лошадей, копытка северных оленей, некротический стоматит поросят.

Р. Кох в 1881 г. выделил возбудителя некробактериоза, а в 1882 г. его подробно описал Леффлер. В нашей стране болезнь изучали Н. Н. Андреев и П. В. Павельский (1931), А. Г. Ревнивых (1932), Н. Камбулин (1937), И. В. Попов (1939), Я. Р. Коваленко (1945) и др.

Морфология. Возбудитель — *Fusobacterium necrophorum*, входит в род *Fusobacterium* (веретенообразных). Это полиморфный неподвижный микроорганизм, спор и капсул не образует, грамотрицательный. В мазках из свежего материала имеет вид отдельных палочек шириной 0,5–1,5 и длиной 1,5–3 мкм или длинных (от 30 до 400 мкм) нитей. Хорошо красится фуксином Циля, синью Леффлера, а также по методу Муромцева. При окраске обычными анилиновыми красителями окрашивается неравномерно.

В свежих культурах, в мазках из некротических очагов имеет форму длинных, зернисто окрашенных, переплетающихся нитей, часто с колбовидными утолщениями, шаровидными вздутиями, окрашивающимися более интенсивно.

В мазках из старых культур и отпечатках из хронических очагов поражения, особенно инкапсулированных, фузобактерии имеют форму коротких палочек длиной 0,7–4 и шириной 0,3–0,5 мкм. Окрашиваются они зернисто, неравномерно, часто по концам более интенсивно. В таких препаратах встречаются также кокковидные формы.

Культивирование. Фузобактерии — облигатные анаэробы. Выделение чистой культуры возбудителя из организма сопряжено с трудностями главным образом вследствие частой ассоциации его в кожных поражениях с другими микробами, особенно стрептококками и стафилококками. Легче получить чистую культуру из внутренних органов пораженного животного — печени, селезенки, легких. Из некротической ткани кожи материал берут из участков, граничащих со здоровой тканью (прижизненные соскобы).

Для культивирования бактерий некроза используют среду Китта — Тароцци, бульон Мартена, печеночный бульон

Хоттингера, сывороточный и глюкозо-кровоной агары, полужидкий агар, мозговую среду. Добавление к среде Китта — Тароцци 10–20% свежей бычьей сыворотки, 0,2–0,5% глюкозы или дрожжевого экстракта приводит к более интенсивному росту микроорганизма. В среде Китта — Тароцци через 24–48 ч происходит помутнение среды, и на кусочках печени образуется хлопьевидный осадок; через 5–8 сут наступает просветление среды и выпадение крошковатого осадка, разбивающегося при встряхивании в равномерную муть. При посеве в сывороточный агар (столбиком) на 3–4-е сутки появляется рост по уколу, формируются небольшие чечевицеобразные колонии, от которых отходят волокнистые отростки.

На поверхности глюкозо-кровоного агара бактерия растет при создании вакуума до 1,3 кПа, на 2–3-е сутки появляются мелкие круглые или продолговатые розинчатые колонии. Иногда колонии окружены слабой зоной гемолиза. Поверхность колоний гладкая, матовая. В аэробных условиях культура продолжает расти, но колонии становятся непрозрачными, шероховатыми.

Микроорганизм хорошо растет на мозговой среде и при добавлении 0,05% сернокислого железа. Среда чернеет за счет образования сероводорода.

Биохимические свойства. Фузобактерии — хемоорганотрофы, одни обладают сахаролитической активностью, другие не ферментируют сахара, но зато ферментируют пептоны. *Fusobacterium necrophorum* ферментирует с образованием кислоты и газа арабинозу, глюкозу, галактозу, левулезу, мальтозу, сахарозу, салицин. Слабо ферментирует лактозу. Желатин и свернутую сыворотку не разжижает, не свертывает яичный белок, слабо и непостоянно пептонизирует молоко, образует индол и сероводород. Аммиак не вырабатывает. Не восстанавливает нитраты в нитриты. Различная биохимическая активность фузобактерий может быть использована для их идентификации.

Устойчивость. Возбудитель некробактериоза — относительно нестойкий микроб, но длительное время сохраняет жизнеспособность в объектах окружающей среды. При воздействии прямых солнечных лучей погибает через 12 ч, в замороженном состоянии бактерии выживают 30–40 сут. При нагревании до 65°C они гибнут в течение 15 мин, при 70°C — через 10 мин,

при кипячении — мгновенно; 5% -е растворы гидроксида натрия или калия убивают их через 10 мин, 2,5% -й раствор креолина — через 20, 5% -й лизол — через 9, 2% -й фенол убивает через 2 мин.

Фузобактерии способны продолжительное время сохраняться и размножаться в слежавшемся навозе, на это указывает частота заболеваний при нахождении животных в обильно унавоженных местах.

Патогенность. В естественных условиях некробактериозом болеют лошади, крупный рогатый скот, буйволы, олени, овцы, козы, свиньи, собаки, кошки, куры, гуси, а также дикие животные — косули, лоси, архары, антилопы, ламы, зебры, бегемоты, бобры, сурки, суслики. К некробактериозу восприимчив и человек. Из лабораторных животных особо чувствительны кролики и белые мыши. В форме тяжелых эпизоотий и энзоотий с высокой смертностью некробактериоз наблюдают у оленей, крупного рогатого скота, овец, свиней.

Естественным резервуаром возбудителя в природе служит желудочно-кишечный тракт здоровых животных. В окружающую среду бактерии выделяются со слюной, жвачкой, мочой, фекалиями больных. Заражение происходит по типу раневой инфекции через поврежденную кожу или слизистые оболочки. Возбудитель передается через почву, подстилку, корма, предметы ухода за животными. Возможен и аутогенный путь заражения.

Заражению и распространению болезни способствуют травмы конечностей, а также содержание животных в грязных и сырых помещениях. Болезнь может возникнуть и как вторичная инфекция при ящуре. У оленей болезнь распространяется летом, что совпадает с летом кровососущих насекомых, реже — осенью; в холодное и дождливое лето пораженность снижается.

Патогенез. На месте проникновения возбудителя может возникнуть патологический процесс при наличии благоприятных условий для размножения возбудителя, а именно: глубокое повреждение тканей, при котором не происходит их аэрация. Первоначально в очаге проникновения бактерий образуется небольшая язвочка, затем в воспалительный процесс вовлекаются окружающие ткани, повреждаются стенки сосудов, откладываются обильные массы фибрина, выходит большое количество

белка, появляются тромбы; в результате этого наступает омертвление мышц, связок, хрящей фаланг конечностей. Из первичного некротического очага возбудитель путем метастаза может мигрировать в легкие, кишечник, печень, селезенку, мозг и другие органы. В зависимости от места локализации вторичного патологического процесса развиваются бронхопневмония, плеврит, перитонит, абсцессы, флегмоны и т. д. Даже легкое течение болезни может осложняться развитием смешанной инфекции. Болезнь в таких случаях приобретает злокачественный характер.

Благоприятный процесс характеризуется прекращением дальнейшего развития патологического процесса, первичный некротический очаг инкапсулируется, и животное выздоравливает.

Лабораторная диагностика. Осуществляется на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Для некробактериоза характерно наличие гнойно-некротических поражений нижних частей конечностей, кожи лицевой части головы, вымени, слизистых оболочек ротовой полости, половых органов. В лабораторию направляют кусочки пораженных органов и тканей с прилегающей здоровой тканью, целые трупы мелких животных, в том числе птиц. Содержимое из некротизированных очагов можно набирать в пастеровские пипетки, запаивать и пересылать в лабораторию.

Для прижизненного исследования берут некротические поражения на границе омертвевшей и здоровой тканей после предварительной очистки от распавшейся ткани и гноя. Из этих же участков готовят препараты-отпечатки. При поражении ротовой полости берут слюну больного животного. В лабораторию все пробы отправляют с нарочным. Патологический материал консервируют; в случае необходимости в 30% -м стерильном глицерине.

Мазки, приготовленные из некротизированной ткани, фиксируют спирт-эфиром 10 мин и окрашивают синью Леффлера или по методу Муромцева, Романовского — Гимзе, а также по Граму. В мазках обнаруживают зернисто окрашенные нити или тонкие длинные грамотрицательные палочки.

Для посевов на среды используют кусочки некротизированной ткани, отобранной на границе со здоровой, которые поме-

щают в среду Китта — Тароцци с добавлением 10% свежей крови и 0,5% глюкозы при рН 7,4–7,6. Посевы инкубируют до 3 сут при 36–38°C. Делают посевы также на глюкозо-кровяной агар. Культуры выращивают в анаэробных условиях. Одновременно проводят биологическое исследование. Кролика заражают подкожно с наружной стороны уха в дозе 0,5–1 мл. Через 2–4 сут на месте введения развивается некротический очаг; на 6–10-е сутки кролик обычно погибает. При вскрытии обнаруживают некротические очаги в мышцах головы, брюшной стенки, сердца, в печени.

Белых мышей заражают бульонной культурой в дозе 0,3–0,5 мл подкожно в области корня хвоста. На 7–8-е сутки в месте инъекции развивается припухлость и нагноение. Мыши погибают на 10–14-е сутки с явлениями некроза мышц, гнойными очагами в печени, легких, сердце.

Некробактериоз у овец необходимо отличать от копытной гнили, контагиозной эктимы, ящура, оспы, стрептококкового полиартрита ягнят, у крупного рогатого скота — от чумы, вирусной диареи, контагиозной плевропневмонии, злокачественной катаральной горячки, стоматитов и дерматитов неинфекционной природы.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают нестойкий иммунитет.

Для специфической профилактики разработаны нековак-ассоциированная вакцина против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота, двухкомпонентная вакцина «Нековак» с иммуностимулятором ГМДП (глюкозаминилмурамилпептид). Лечение проводят комплексно, на специально оборудованных для этой цели площадках с помощью химиопрепаратов, сульфаниламидов (сульфадимезин) и антибиотиков тетрациклинового ряда (хлортетрациклин, тетрациклин, дибиомицин), пенициллинов и др.

14.7.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ КОПЫТНОЙ ГНИЛИ

Возбудитель — *Bacteroides nodosus* (или *Fusifformisnodosus*) относится к семейству *Bacteroidaceae*, роду *Bacteroides*, вызывает инфекционную болезнь у овец и коз, характеризующуюся мацерацией и воспалением кожи свода межкопытной щели,

прогрессирующим гнойно-гнилостным распадом копытного рога и хромотой.

Впервые болезнь описал во Франции Гойэ (1810), а выделил возбудителя Беверидж (1941). Болезнь регистрируют во всех странах мира, где развито овцеводство, главным образом в зонах с повышенной влажностью, на низменных, сырых пастбищах.

Морфология. Возбудитель — крупная (6–8 мкм) прямая или слегка изогнутая, граммотрицательная, неподвижная, полиморфная палочка с утолщениями на одном или обоих концах. Спор и капсул не образует. По внешнему виду напоминает гантели.

Культивирование. *Bact. Nodosus* — облигатный анаэроб. Весьма требователен к составу питательных сред; его удается культивировать в полужидкой среде Китта — Тароцци и жидкой питательной среде из экстракта головного мозга с добавлением 2–5% триптического перевара порошка копытного рога. На этих средах микробы растут в виде тяжей, на дне пробирки образуют осадок. На лактоальбуминовом агаре вырастают плоские блестящие шероховатые колонии. Бактерии содержат поверхностный термолабильный К-антиген, дающий хлопчатый, легко разбивающийся агглютинат, и соматический термостабильный О-антиген, образующий мелкозернистую агглютинацию. Возбудитель непатогенен для лабораторных животных и куриных эмбрионов.

Устойчивость. К факторам окружающей среды устойчивость возбудителя незначительная. На пастбищах микроб сохраняется не более двух недель. Нагревание до 90°C убивает его за 1 мин. Дезинфицирующие растворы креолина (3%), формалина (0,5%), фенола (2%) убивают в течение 15–20 мин. При доступе воздуха он погибает через 24 ч, однако в пораженном роге сохраняется до трех лет.

Патогенез. Возбудитель, попав на мацерированную поверхность кожи свода межкопытной щели, начинает размножаться и вырабатывать фермент протеазу, разрушающий белок эпидермиса кожи — кератин. Бактерии также выделяют токсин, вызывающий воспаление и гнойно-гнилостный распад тканей. Развивается глубокий гнойный пододерматит, флегмоны венчика, гнойный артрит копытного сустава и сепсис. Инкубационный период составляет 3–6 сут. Болезнь протекает, как правило, хронически.

Диагноз. Ставят на основании анализа эпизоотологических и клинических данных, результатов бактериологической диагностики и биологической пробы. Для исследования необходимо брать свежепораженные участки основы кожи копытцев и слизь, покрывающую кожу межпальцевых щелей. Бактериологическая диагностика осуществляется по общепринятой методике. Для биопробы используют ягнят.

Для серологической диагностики болезни предложена РСК. Комплементсвязывающие антитела у животных появляются с началом заболевания, достигают максимальных значений в разгар болезни и угасают с исчезновением клинических признаков. Идентифицировать возбудителя можно при помощи непрямого метода иммунофлюоресценции.

Данную болезнь следует отличать от некробактериоза, ящура, эктимы, оспы, травматического повреждения копыт.

Иммунитет. Изучен недостаточно. Установлено, что в сыворотке крови больных и вакцинированных животных появляются агглютинины к О- и К-антигенам возбудителя, а также комплементсвязывающие антитела. Для активной иммунизации в ряде зарубежных стран (Англия, Австрия, Чехия, Словакия) применяют инактивированные вакцины.

Лечение. Больных животных лечат или убивают. Для лечения используют ножные ванны с 10%-м раствором сульфата цинка и 5–10%-м раствором формалина, 10–12%-м раствором медного купороса. С лечебной целью показана антибиотикотерапия.

14.7.3. ЭНТЕРОБАКТЕРИИ

Семейство энтеробактерий — *Enterobacteriaceae* — относится к порядку *Eubacteriales* — собственно бактерии. По современной классификации оно включает 12 родов: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Iersinia* и *Erwinia*. В патологии домашних животных наибольшее значение имеют роды *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Iersinia*.

Энтеробактерии широко распространены в природе. Эта многочисленная группа возбудителей включает патогенные, условно-патогенные и сапрофитные виды. Патогенные виды и серовары вызывают болезни, различающиеся клиническим

проявлением (кишечные инфекции, септицемии, пневмонии, аборт у животных, артриты, маститы и т. д.), поэтому название семейства больше соответствует месту их обитания. Отмечено, что ферментативная активность энтеробактерий больше выражена у сапрофитных и условно-патогенных видов, в меньшей степени — у патогенных видов как проявление одной из форм эволюции паразитизма. Наряду с большой универсальностью есть виды (серовары) бактерий, вызывающие болезни только у одного вида животных, иногда с выраженным тропизмом к определенным тканям и органам (сальмонеллы аборта овец и лошадей, брюшного тифа, дизентерии человека).

ВОЗБУДИТЕЛИ КОЛИБАКТЕРИОЗА

Возбудитель колибактериоза — *Escherichia coli*. Впервые ее выделил в 1885 г. Т. Эшерих из фекалий больного ребенка. Согласно определителю бактерий Берджи (1997) род *Escherichia* внесен в пятую секцию, семейство *Enterobacteriaceae*. Род представлен двумя видами: *E. coli*, выделяется от человека, животных, в том числе итиц, и *E. blatta*, выделяется от насекомых. *E. coli* — постоянный обитатель толстого кишечника человека, млекопитающих, птиц и рыб. В большом количестве содержится в окружающей среде.

Колибактериоз (колиэнтерит, колисептицемия, эшерихиоз, колиинфекция) — остро протекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных, включая птиц и пушных зверей.

Возбудитель — патогенные серологические варианты *E. coli*. Болезнь протекает в септической, энтеротоксемической и энтеритной формах. У поросят отъемного возраста болезнь иногда проявляется в виде отечной формы, сопровождаясь высокой летальностью. У молодняка птиц колибактериоз протекает преимущественно в септической форме, а у взрослых — в хронической.

Морфология. *E. coli* — полиморфные палочки с закругленными концами длиной 1–3 и шириной 0,5–0,8 мкм. Располагаются одиночно, реже попарно. По Граму красятся отрицательно, спор не образуют, отдельные серовары (08, 09, 0101) образуют капсулы, подвижные (перитрихи), но встречаются и неподвижные (рис. 31).

Культуральные свойства. E. coli — аэроб или факультативный анаэроб. Оптимальная температура роста 37–38°C, рН среды 7,0–7,4. Хорошо растет на обычных питательных средах — МПА, МПБ, средах Эндо и Левина. На МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, с ровными краями и гладкой поверхностью (S-форма) серо-белого цвета колонии. В МПБ — интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании. На среде Эндо *E. coli* образует два типа колоний: ярко-малинового цвета с металлическим блеском или без него и светло-красные с розовым ободком, диаметром 2–3 мм. На среде Левина колонии темно-фиолетовые или черные.

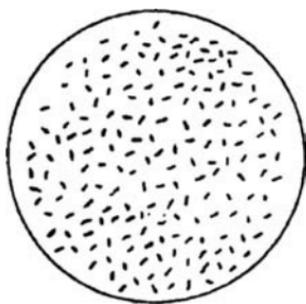


Рис. 31
E. coli

Биохимические свойства. E. coli обладает высокой ферментативной активностью — ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, маннит; сахарозу и дульцит ферментирует не постоянно, не изменяет адонит и инозит, образует индол, не образует H_2S , желатин не разжижает, на среде Симмонса не растет, дает положительную реакцию с метиловым красным (среда ярко-розового цвета), отрицательную реакцию Фогеса — Проскауэра (среда желтого цвета), мочевины не расщепляет.

Антигенная структура. У *E. coli* сложная антигенная структура. Клетка содержит три вида антигенов: О — соматический, К — поверхностный, капсульный, оболочечный и Н — жгутиковый.

О-антиген представляет собой термостабильный липополисахаридно-белковый комплекс, не разрушается при нагревании до 100°C в течение 2,5 ч. Его белковый компонент обуславливает иммуногенные свойства, липоидный — токсичность (эндо-токсин), полисахаридный — серологическую специфичность.

К-антиген полисахаридной природы состоит из группы поверхностных антигенов трех видов: L, В и А. L-антиген термолабильный, инактивируется при 100°C в течение 1 ч. Культуры, содержащие этот антиген, более токсичны для мышей,

обладают некротизирующими свойствами, часто вызывают гемолиз эритроцитов. Колонии этих культур непрозрачны. В-антиген термолabileный, инактивируется также при 100°C в течение 1 ч. А-антиген капсульный, полисахаридной природы, термостабильный, разрушается при 120°C в течение 2,5 ч. Культуры с А-антигеном непрозрачные, слизистые, устойчивы к фагоцитозу и бактериолизу. К-антигены обуславливают феномен О-инагглютинабельности. Н-антиген, или жгутиковый, имеет белковую природу, характеризуется антигенной активностью.

Эшерихии также имеют поверхностные структуры, названные фимбриями, или ворсинками-пили (*pili*). Ворсинки-пили являются факторами колонизации бактерий в тонком кишечнике, т. е. за счет ворсинок-пили происходит адгезия (прикрепление) бактерий к клеткам слизистой кишечника с последующим размножением их и развитием воспалительного процесса с наличием диарей. Эти адгезивные антигены по физическим, химическим, функциональным и антигенным свойствам отличаются друг от друга и имеют различные обозначения — К88, К99, 987Р, F41 и др.

Антигенное строение эшерихии принято выражать формулой, за буквенным обозначением каждого антигена идут цифры, отделяемые двоеточием, например: 055:К59 (В):Н6; 0111:В5:Н10. Известно около 170 серогрупп эшерихии, различающихся по О-антигену, 100 различных вариантов К-антигенов и около 60 типов Н-антигенов. Основу антигенно-диагностической схемы эшерихий составляет разделение их на серологические группы по О-антигенам. Биопромышленность для ветеринарных целей выпускает агглютинирующие О-колисыворотки для определения серогрупповой принадлежности.

Устойчивость. Эшерихии сравнительно устойчивы к воздействию факторов окружающей среды. В богатой гумусом почве они сохраняют жизнедеятельность от 4 до 6 мес., во влажном навозе — до 7 мес., в воде — от 3 до 5 мес. Неустойчивы к воздействию высокой температуры. При нагревании суспензии до 60°C погибают в течение 10 мин, при 100°C — моментально. Многие дезинфицирующие вещества в обычных концентрациях губительно действуют на них: 2% -й раствор активного хлора; 2,0% -й раствор формальдегида; 3% -е растворы гидроксида

натрия и однохлористого йода; хлорсодержащие препараты с 5%-м содержанием активного хлора.

Эшерихии в большинстве случаев чувствительны к действию полимиксина, гентамицина, рифампицина, хлорамфеникола, менее чувствительны к тетрациклинам, стрептомицину, нитрофурановым и сульфаниламидным препаратам. Необходимо учитывать, что эшерихии обладают способностью быстро приобретать устойчивость ко многим антибактериальным препаратам.

Патогенность. Патогенные свойства у эшерихии обусловлены комплексом факторов: наличием эндотоксина, энтеротоксинов, гемолизина и образованием колицинов; адгезинов.

Эндотоксин представляет собой соматический антиген (O-антиген), термостабилен, относится к энтеротропным ядам, вызывает воспалительные процессы в кишечнике, некроз слизистой оболочки, диарею, лейкопению, гипотонию и др.

Эшерихии продуцируют два типа энтеротоксинов (экзотоксинов) — термостабильный (ТС) и термолабильный (ТЛ). Термостабильный токсин низкомолекулярный, не обладает антигенными свойствами. ТЛ-токсин — вещество белковой природы, иммуногенен, разрушается при 56°C за 30 мин, обладает нейтротропным и некротизирующим свойствами. Вызывает расширение изолированных петель кишки кролика и образование в них серозно-геморрагического экссудата. Некоторые штаммы эшерихий продуцируют оба токсина одновременно или только какой-нибудь один. Отдельные серовары образуют гемолизины, лизирующие эритроциты крови, а также сильнодействующие веротоксины, вызывающие геморрагический гастроэнтерит и токсемию (серовары 0157:H7 и 0157:H).

Адгезивными свойствами обладают энтеротоксигенные штаммы эшерихий. За счет фимбрий (пили) они прикрепляются к эпителию тонких кишок и, размножаясь на его поверхности, продуцируют энтеротоксин.

Многие патогенные и некоторые непатогенные штаммы эшерихий образуют колицины — вещества белковой природы, подавляющие рост и развитие филогенетически родственных бактерий. Известно более 25 различных колицинов, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита, — А, В, С и др. Считают, что колициногенность у патогенных эшерихий

способствует их распространению в кишечнике и поэтому может рассматриваться как один из факторов патогенности.

В настоящее время выявлены основные серогруппы эшерихий, патогенные для животных и человека. У телят чаще всего выделяют серогруппы 08, 09, 015, 078, 086, 0101, 0117, 0119, 0141, 0157 и др.; у поросят — 08, 09, 0137, 0138, 0139, 0141, 0142, 0147, 0157 и др.; у ягнят — 08, 09, 026, 078, 086, 011, 0127; у птиц — 01, 02, 078, 086, 0115 и др.; у пушных зверей — 02, 020, 086, 078, 0125 и др.; у человека — 026, 055, 0111, «Крым» и др.

Патогенез. Основной путь заражения — алиментарный, у птиц — аэрогенный.

Септическую форму колибактериоза обуславливают штаммы эшерихий, не обладающие адгезивными антигенами. Вирулентность этих штаммов связана с наличием инвазивных свойств и капсульных антигенов, состоящих из кислых полисахаридов, которые обеспечивают проникновение этих бактерий в лимфатическую систему, а затем в кровь, внутренние органы и ткани, где они интенсивно размножаются при недостатке в организме иммуноглобулинов. При обитании в организме эшерихии частично разрушаются. Образовавшийся эндотоксин может вызвать шок, который сопровождается быстро наступающей слабостью, сосудистым коллапсом. Септическая форма характеризуется сверхострым и острым течениями с высокой летальностью.

Энтеротоксемическую форму болезни обуславливают энтеротоксигенные эшерихии, которые прикрепляются с помощью адгезивных антигенов к поверхности энтероцитов тонкого кишечника, размножаются и продуцируют энтеротоксины. При накоплении энтеротоксинов повышается активность кишечной гуанилциклазы, что обуславливает гиперсекрецию жидкости и электролитов в просвет кишечника, возникает диарея, развивается токсикоз.

Лабораторная диагностика. Для бактериологического исследования в лабораторию направляют фекалии, свежий труп или тяжело больное мелкое животное. Если доставка трупа невозможна, то посылают голову (головной мозг), трубчатую кость, селезенку, долю печени с желчным пузырем, брыжеечные лимфатические узлы, в отдельной посуде — пораженный

отрезок тонкого кишечника. Для диагностики колибактериоза птиц кроме свежих трупов направляют 5–6 больных птиц.

В первый день делают посевы из патологического материала в МПБ, на скошенный МПА и на чашки со средой Эндо или Левина, в среду с сорбитом, фекалии — на среду Эндо или Левина, готовят и микроскопируют мазки. На второй день просматривают культуры на средах, производят отбивку колоний в МПБ и после 4 ч инкубирования в термостате делают посев на пластинчатый МПА и среду Минка в чашках для приготовления антигена и заражения белых мышей (цыплят). На третий день готовят и исследуют под микроскопом мазки, предварительно учитывая ферментативные свойства. На четвертый день заражают белых мышей (цыплят), готовят антиген и ставят реакцию агглютинации с антиадгезивными колизыворотками для определения серогрупповой принадлежности. Пятый день — имеются предварительные результаты биопробы и реакции с колизыворотками. На шестой-седьмой день подводят окончательные результаты по биопробе и ферментативным свойствам культур. Оформляют экспертизу.

Культура эшерихий считается патогенной в случае гибели двух или более мышей в течение 2 сут после заражения или при гибели в первые четыре дня после заражения одного цыпленка или более. Патогенные культуры серологической типизации не подвергают.

Бактериологический диагноз «колибактериоз» у млекопитающих считают установленным при выделении культур эшерихий из селезенки, костного или головного мозга без определения их патогенности и серологической принадлежности; при выделении не менее чем из двух органов животного культур эшерихий, патогенных для белых мышей или принадлежащих к О-серогруппам, признанным патогенными для животных. У птиц — при выделении патогенных для цыплят эшерихий из костного мозга, крови или печени.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Известно, что у новорожденных животных факторы естественной защиты еще развиты слабо и они не в состоянии обеспечить защиту от патогенных эшерихий. В неблагополучных хозяйствах с целью создания колострального иммунитета за 1–2 мес. до родов вакцинируют стельных коров, супоросных свиноматок, суягных овец вакциной «Коли-вак» согласно наставлению.

Для создания пассивного иммунитета телятам вводят колипротектант ВИЭВ (взвесь убитой нагреванием культуры эшерихий одной серогруппы, отмытой от токсинов и консервированной формалином) перорально в дозе 10–15 мл за 30 мин до выпойки молозива и затем по 10 мл пять раз с молозивом в течение двух дней.

Пушных зверей с целью создания колострального иммунитета вакцинируют поливалентной вакциной против сальмонеллеза и колибактериоза.

У птиц для создания трансовариального иммунитета аэрозольно вакцинируют родительское стадо инактивированной вакциной против колибактериоза за 7–10 сут до взятия от кур яиц на инкубацию. Пассивный иммунитет у цыплят, полученных из яиц вакцинированных кур, сохраняется до 20 сут. В дальнейшем цыплят и взрослую птицу вакцинируют с целью создания активного иммунитета аэрозольно или перорально (с питьем) согласно наставлению.

Для профилактики и терапии колибактериоза используют антиаггезивную гипериммунную сыворотку согласно наставлению. Также с профилактической целью применяют колибактериозный бактериофаг, выпаивая его по схеме в течение нескольких дней. Из средств антибактериальной терапии — антибиотики, нитрофурановые и сульфаниламидные препараты с учетом чувствительности к ним эшерихий.

ВОЗБУДИТЕЛИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ

Сальмонеллезы — группа инфекционных болезней преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных, птиц.

Американские ветеринарные врачи Д. Сальмон и Т. Смит в 1885 г. выделили из органов свиней, павших от чумы, микроб, названный позже *Bact. suispestifer*. В 1888 г. А. Гертнер при выяснении этиологии отравлений людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека. Он был назван *Bact. enteritidis*. В 1892 г. Ф. Леффлер выделил от павших мышей микроб, получивший название *Bact. typhimurium*. В честь Сальмона микроорганизм, выделенный им, был назван сальмонеллой, а пищевое отравление, вызываемое микробом, — сальмонеллезом.

В настоящее время известно более двух тысяч серовариантов сальмонелл, объединенных в один род — *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Морфология. Сальмонеллы — мелкие палочки с закругленными концами длиной 1–4 и шириной 0,3–0,8 мкм. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму окрашиваются отрицательно (рис. 32).

Культуральные свойства. Сальмонеллы — аэробы и факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста 37°C, рН среды 7,0–7,2, однако могут расти и при рН ниже 7,0 или до 8,0 и выше. Хорошо растут на обычных питательных средах МПА, МПБ, средах Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агаре и др.

На МПА образуют небольшие, диаметром 1–2 мм, круглые колонии с ровными краями, серо-белого цвета с голубоватым оттенком. У некоторых видов сальмонелл по краю колонии заметен выпуклый слизистый вал. На среде Эндо колонии прозрачные, бледно-розового цвета, на среде Левина — прозрачные с голубоватым оттенком, на среде Плоскирева — бесцветные, слегка мутноватые, на висмут-сульфитном агаре — черного цвета с металлическим блеском. В МПБ — слабое помутнение, на дне пробирки осадок серо-белого цвета, на поверхности среды в старых культурах иногда тонкая пленка или пристеночное кольцо.

Биохимические свойства. Сальмонеллы не ферментируют сахарозу, не разлагают лактозу, адонит, не расщепляют салицин и мочевины, не образуют индола, образуют сероводород; реакция Фогес — Проскауэра отрицательная, реакция с метиловым красным — положительная. Глюкозу ферментируют все виды (серовары) сальмонелл с образованием газа и кислоты или только кислоты без газа. Большинство сальмонелл ферментируют маннит. Следует иметь в виду, что биохимическая активность у сальмонелл различных сероваров варьирует.

Антигенная структура. Представлена соматическим, или O-анти-

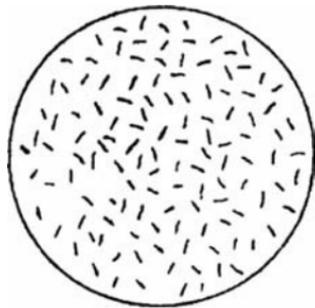


Рис. 32
Сальмонеллы

геном, и жгутиковым (H-антигеном). O-антиген расположен на поверхности микробной клетки и представляет собой термостабильный фосфолипидно-полисахаридный комплекс, не разрушающийся при кипячении в течение 2 ч. H-антигены обладают как специфическими свойствами, характерными для определенного вида (антигены первой фазы), так и неспецифическими (антигены второй фазы). Если сальмонеллы содержат оба жгутиковых антигена, их называют двухфазными, если один — однофазными.

На основании общности соматических O-антигенов сальмонеллы объединены в серологические группы, которые обозначены прописными буквами латинского алфавита: A, B, C, D и др. Всего установлено свыше 60 серологических групп. В лабораториях используют диагностическую схему Кауфмана — Уайта, построенную на анализе O- и H-антигенов. В соответствии с особенностями антигенной структуры каждая группа объединяет большое количество сероваров, расположенных в алфавитном порядке по обозначению первой фазы их H-антигена. При этом первая фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (a, b, c, d, e и т. д.), вторая — арабскими цифрами или латинскими буквами (1, 2, 5, 6; e, d и т. д.).

Для определения серовара сальмонелл биофабрики выпускают поливалентные O-сыворотки, O-моносыворотки, а также монорецепторные H-сыворотки, которые используют в реакции агглютинации на стекле, с живыми суточными культурами на плотной питательной среде.

Антигенная структура сальмонелл основных видов, вызывающих заболевания животных, в том числе птиц, представлена в таблице 5.

Клинически выраженную болезнь у животных вызывают сальмонеллы сравнительно немногих сероваров.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды. При 60°C погибают в течение 1 ч, при 100°C — моментально. В сухой почве сохраняются от 145 до 270 сут; в высушенном навозе — от 1 до 1,5 лет; в трупах — до 100 сут; в открытых водоемах и питьевой воде — от 11 до 120 сут; в замороженном мясе — от 6 мес. до 3 лет; в колбасных изделиях — от 60 до 130 сут; в скорлупе яиц — до 3 мес; в яичном порошке — до 9 мес; на замороженных овощах и фруктах — от

Антигенная структура сальмонелл

Серогруппа	Серовары	О-антигены (соматические)	Н-антигены (жгутиковые)	
A	<i>S. Paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	—
B	<i>S. scholtmuelleri</i> (<i>paratyphi B</i>)	1,4(5), 12	b	1, 2
	<i>S. typhimurium</i>	1,4(5), 12	i	1, 2
	<i>S. abortusegui</i>	4, 12	—	e, n, x
	<i>S. abortusbovis</i>	1, 4, 12, 27	b	e, n, x
	<i>S. abortusovis</i>	4, 12	c	1, 6
	<i>S. derby</i>	1,4(5), 12	f, g	—
C	<i>S. paratyphi C</i> (<i>hirschfeldii</i>)	6, 7, Vi	c	1, 5
	<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
	<i>S. typhisuis</i>	6, 7	c	1, 5
	<i>S. infantis</i>	6, 7	r	1, 5
D	<i>S. typhi</i>	9, 12, Vi	d	—
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12	1g, m	—
	<i>S. dublin</i>	1, 9, 12	g, p	—
	<i>S. gallinarum</i> - <i>pullorum</i>	1, 9, 12	—	—
E	<i>S. anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
	<i>S. london</i>	3, 10	i, v	1, 6

2 нед. до 2,5 мес. Обычное копчение (в домашних условиях) не убивает сальмонелл. В соленом мясе сохраняются 4–8 мес. При воздействии прямых солнечных лучей погибают через 5–9 ч. Дезинфицирующие вещества (2% -й раствор фенола, 3% -й раствор гидроксида натрия, хлорсодержащие растворы с 5% активного хлора, 3% -й раствор формальдегида) убивают сальмонелл в течение 15–20 мин.

Сальмонеллы чувствительны к гентамицину, неомицину, тетрациклину, левомицетину, стрептомицину, менее чувствительны к сульфаниламидным и нитрофурановым препаратам.

Патогенность. Патогенные свойства сальмонелл обуславливают два вида токсинов: экзотоксины и эндотоксины. Первые

являются продуктами жизнедеятельности, активно (при жизни) продуцируемыми в окружающую среду. Вторые образуются в результате лизиса клеток. Основной компонент эндотоксина — полисахарид. Молекула его состоит из двух компонентов: полисахарида и липида А, который определяет токсичность всей молекулы.

Эндотоксины вызывают геморрагическое воспаление кишечника, кормовое отравление у свиней и плотоядных. Экзотоксины — яды исключительно высокой активности; избирательно поражают отдельные органы и ткани.

Патогенез. Основные пути заражения — алиментарный и аэрогенный, возможно внутриутробное и трансвариальное заражение у птиц. Сальмонеллы вначале размножаются в тонких кишках, затем через кишечные ворсинки проникают в лимфатическую систему, кровь, током крови разносятся в паренхиматозные органы, где размножаются. При гибели бактерий высвобождаются эндотоксины, вызывающие воспалительные, дистрофические, некробиотические и другие изменения в тканях органов и кровоизлияния в них, последние отмечаются и на серозных покровах и в слизистых оболочках кишечника и мочевого пузыря. Больные животные выделяют сальмонеллы в основном с фекалиями и мочой, птицы — с пометом, яйцами.

У животных сальмонеллезы проявляются в виде первичных и вторичных сальмонеллезов и бактерионосительства. Первичные сальмонеллезы характеризуются свойственными тому или иному виду животных симптомами и вызываются определенными серовариантами сальмонелл. Вторичные сальмонеллезы наслаиваются на основную болезнь и осложняют ее (чума свиней). При этом характерные для сальмонеллеза симптомы слабо выражены.

Бактерионосители сальмонелл — животные, которые, будучи клинически здоровыми, выделяют сальмонеллы с фекалиями, мочой. Они представляют особую опасность не только как источник инфекции для молодняка, но и как источник токсиноинфекции для людей в случае употребления в пищу продуктов от таких животных.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая прижизненная диагностика основана на исследовании крови в первые дни заболевания, истечений из родовых путей и фекалий. У птиц

при жизни исследуют кровь со специфическим антигеном в пластинчатой РА.

Посмертно в лабораторию направляют свежие трупы мелких животных и птиц, от трупов крупных животных — паренхиматозные органы или части их (печень с желчным пузырем), селезенку, почку, мезентериальные лимфатические узлы, трубчатую кость, от телят — измененные участки легких; в случае аборта — свежий плод.

Полученный материал высевают в МПБ, на МПА и дифференциальные среды — Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агар, а при подозрении на хроническое течение болезни — дополнительно на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера и др.).

Полученные на средах культуры дифференцируют и идентифицируют на основании морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств согласно существующим наставлениям.

Метод флюоресцирующих антител применяют как экспресс-метод обнаружения сальмонелл в исследуемом материале. Для этого готовят мазки-отпечатки, фиксируют химическим методом и окрашивают сальмонеллезными флюоресцирующими сыворотками. Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом.

Фаготипирование сальмонелл — с диагностической целью используют поливалентные и типовые сальмонеллезные фаги. На скошенный агар засевают суточную культуру сальмонелл, а затем под углом наносят пастеровской пипеткой каплю фага в среднюю часть агара. Пробирки помещают в термостат и через 24 ч просматривают. На месте стекающей капли роста сальмонелл не будет — «стерильная зона».

Иммунитет и средства специфической профилактики. Клинически выраженную болезнь у животных вызывают сальмонеллы сравнительно немногих сероваров.

У телят болезнь протекает остро и хронически с наличием лихорадки, расстройства функции кишечника, воспаления легких. Основные возбудители *S. dublin*, а также *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. После переболевания у них формируется напряженный иммунитет. В стационарно неблагополучных по сальмонеллезу хозяйствах вакцинируют стельных коров

концентрированной формолвакциной двукратно через 10–12 сут за 30–45 сут до отела. Новорожденный с молозивом получает специфические антитела (колостральный иммунитет). Телят от вакцинированных коров иммунизируют в возрасте 12–15 сут живой или убитой вакциной.

Чаще болеют **поросята** до 4-месячного возраста. Болезнь сопровождается лихорадкой, диареей и дегенеративными процессами в тонком и толстом кишечнике. Возбудители — *S. choleraesuis* или *S. typhisuis*, в отдельных случаях *S. typhimurium* и *S. dublin*. После переболевания у поросят формируется стойкий иммунитет. С профилактической целью в неблагополучных хозяйствах используют формолвакцину против паратифа поросят, приготовленную из штаммов *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*. Свиноматок вакцинируют не позднее чем за 1,5–2 мес. до опроса. С профилактической целью применяют сухую живую вакцину против паратифа свиней из аттенуированного штамма *S. choleraesuis* ТС-177: прививают всех клинически здоровых поросят с 2-недельного возраста. Для вакцинации поросят и супоросных свиноматок с профилактической целью в хозяйствах, неблагополучных по паратифу, пастереллезу и диплококковой септицемии применяют ассоциированную поливалентную вакцину.

У **ягнят** сальмонеллез сопровождается диареей, повышением температуры тела, иногда с пневмонией, у взрослых овец происходят аборт за месяц до окота. Возбудитель — *S. abortusovis*, иногда *S. typhimurium*. У абортировавших овец формируется длительный и напряженный иммунитет. С целью профилактики в неблагополучных хозяйствах используют поливалентную формолтиомерсальную вакцину.

Сальмонеллез у **жеребых кобыл** проявляется абортами, у **жеребят** — артритами, лихорадкой, диареей. Возбудитель — *S. abortusequi*, реже *S. typhimurium*. Повторные аборты сальмонеллезной этиологии у кобыл бывают редко, что свидетельствует о наличии у переболевших иммунитета. Средств специфической профилактики нет.

Возбудители сальмонеллеза пушных зверей. Сальмонеллез вызывают *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, реже другие виды. Болеют серебристо-черные лисицы, песцы, нутрии, реже норки, еноты, соболи и речные бобры. Болезнь протекает остро и сопровождается высокой лихорадкой, энте-

ритом, истощением. У беременных наблюдается рождение мертвых плодов или нежизнеспособных щенков. Звери, переболевшие сальмонеллезом, приобретают напряженный иммунитет. Для иммунизации лисиц и песцов применяют поливалентную вакцину против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей. Больных и подозреваемых в заражении лечат гипериммунной антитоксической сальмонеллезной сывороткой, антибиотиками, фуразолидоном.

Возбудители сальмонеллеза птиц. У молодняка птиц сальмонеллез протекает остро, сопровождается поносом, нервными явлениями, параличом и в форме септицемии. У взрослой птицы болезнь часто протекает латентно, редко как энзоотия. Возбудители — *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. typhimurium*, реже *S. anatum*, *S. infantis* и др. *S. gallinarum-pullorum* вызывает пуллороз (тиф) птиц — остро и подостро протекающую болезнь отряда куриных, до 30–60-суточного возраста с высокой летальностью. У взрослой птицы сальмонеллез чаще протекает бессимптомно. Иммунитет — нестерильный. Средства специфической профилактики отсутствуют. С целью массового обследования птицы и выявления сальмонеллоносителей применяют кровекapельную реакцию агглютинации.

Возбудители сальмонеллеза водоплавающей птицы. Наиболее часто возбудителями являются *S. typhimurium*, реже *S. anatum* и др. Болеют утята и гусята, реже цыплята. Среди утят и гусят сальмонеллез протекает остро в 6–20-суточном возрасте, птицы старше 2,5-месячного возраста болеют хронически, а взрослые — латентно. Взрослые утки и гуси обладают естественной устойчивостью к сальмонеллезу. Для профилактики рекомендована сухая живая вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы. Вакцину вводят двукратно перорально утятам и гусятам с 3-суточного возраста с интервалом в два дня.

14.7.4. ИЕРСИНИИ

Иерсинии (*Yersinia*) — род палочковидных грамотрицательных бактерий из семейства энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*). Для животных и человека патогенны *Yersinia pestis* — возбудитель антропозоонозной чумы; *Yersinia pseudotuberculosis* — возбудитель псевдотуберкулеза; *Yersinia enterocolitica* вызывает кишечный иерсиниоз.

ВОЗБУДИТЕЛЬ АНТРОПОЗООНОЗНОЙ ЧУМЫ

Возбудитель антропозоонозной чумы (*Yersinia pestis*) вызывает острую инфекционную болезнь, характеризующуюся тяжелой интоксикацией, поражением лимфатической системы, тенденцией к септицемии. Чума — природно-очаговая болезнь, возбудитель которой в естественных условиях сохраняется благодаря циркуляции среди грызунов. Заражению здоровых животных способствуют переносчики, прежде всего блохи. Из сельскохозяйственных животных к чуме наиболее восприимчивы верблюды: заражаются в периоды интенсивной эпизоотии чумы грызунов и представляют собой опасный источник заражения людей.

Бактерию чумы открыли и выделили в чистой культуре в 1894 г. С. Китазато и А. Иерсен во время эпидемии чумы в Гонконге. В честь Иерсена бактерия получила родовое название «иерсиния».

Морфология. *Yersinia pestis* — полиморфная граммотрицательная палочка 1–2 мкм в длину и 0,3–0,5 мкм в ширину. Спор не образует, жгутиков не имеет. При выращивании на влажных и кислых питательных средах при 37°C вокруг палочек образуется мукоидная оболочка в виде капсулы. В препаратах из органов и крови ее находят очень редко.

Бактерия чумы окрашивается биполярно всеми анилиновыми красителями, лучше всего синькой Леффлера и по Романовскому — Гимзе. Микробы в форме палочек обнаруживают в мазках из органов и крови животных, погибших от острой формы чумы, при хроническом течении процесса бактерии шарообразной формы, плохо окрашиваются. В мазках на 1–2-суточных бульонных культурах возбудитель окрашивается биполярно и располагается в виде коротких и длинных цепочек, а в культурах на пластинке агара в чашке Петри — в виде мелких коротких палочек с плохо выраженной биполярностью; в препаратах из культур с влажного скошенного в пробирках МПА и особенно из конденсационной жидкости биполярная окраска четкая.

Культивирование. Этот факультативный анаэроб растет на обычных питательных средах при 28–30°C и рН 7–7,2. Темп роста замедленный, поэтому в питательные среды добавляют

различные стимуляторы (кровь, сульфат натрия и др.). На пластинках агара растет в виде блестящих, серовато-белых, прозрачных, суховатых колоний с выпуклым мелкозернистым центром и плоскими волнистыми краями, напоминающими кружева. Со временем центр колоний приобретает коричневый оттенок, становится более грубым и менее прозрачным. Колонии, выращенные при 17°C, маслянистые, легко суспендируются, иногда тянутся за петлей. На скошенном агаре в пробирке образует сероватый, вязкий, нежный, прозрачный налет. В бульоне отмечают агглютинативный рост с поверхностной нежной пленкой, при малейшем движении падающей на дно в виде сталактитов и образующей рыхлый осадок.

В первичных культурах чаще выделяют типичные шероховатые колонии R-формы, они, как правило, вирулентные. При длительном культивировании возбудителя на искусственных питательных средах вырастают гладкие авирулентные S-формы. Среди них при определенных условиях могут быть и вирулентные клоны. Гладкие формы нестойки и при пересевах очень быстро образуют шероховатые и переходные формы.

Биохимические свойства. Бактерия чумы обладает определенной ферментативной активностью. Разлагает глюкозу, арабинозу, левулезу, мальтозу и маннит без газа. Лактозу и сахарозу обычно не сбраживает, молоко не свертывает, гемолитическая активность непостоянна. Может выделять сероводород; индол не продуцирует. Мочевину не разлагает, метиленовый синий не редуцирует.

Антигенная структура. Выделено около десяти антигенов. Важнейшими из них являются оболочечный, или капсульный (фракция F1), термолабильный белок и O-антиген — соматический термостабильный полисахарид. Оба антигена иммуногенны. У бактерий патогенных штаммов субстратом вирулентности служит антигенная система VW. Антиген V — белок клеточной стенки, W — липопротеид, выделяемый в процессе роста в среду. Комплекс VW угнетает фагоцитоз чумной палочки.

Существует специфический чумной бактериофаг, применяемый для индикации микроба.

Устойчивость. Бактерия чумы малоустойчива к действию физических и химических факторов. Вне организма погибает быстро. Низкие температуры переносит хорошо (при -22°C

сохраняется 4 мес.). При кипячении гибнет через 1 мин, сухой жар (100°C) убивает микроб через 20 мин. Чувствительна к дезинфектантам: 3% -й раствор лизола убивает через 1,5 мин, 3% -й раствор карболовой кислоты — через 5–10, 70% -й спирт — через 3–5 мин.

Возбудитель чумы чувствителен к стрептомицину, дигидрострептомицину, окситетрациклину, мономицину, гентамицину.

Патогенность. Вирулентность различных штаммов возбудителя чумы неодинакова, включая штаммы, изолированные от животных и людей. Бактерия чумы выделена более чем от 160 видов грызунов. Этот микроб патогенен для верблюдов, ослов, кошек, шакалов, лисиц, хорьков и ласок, которые могут заразиться в естественных условиях и заболеть. Восприимчивы обезьяны и люди. Экспериментально удается заразить белых мышей, крыс, морских свинок, кроликов, сурков, песчанок, ондатр, водяных крыс и др. Морские свинки и белые мыши наиболее чувствительны, поэтому их используют для биопробы.

Возбудитель чумы вырабатывает токсические вещества типа эндо- и экзотоксинов; в составе экзотоксина обнаружены две белковые фракции (А и В), различающиеся по аминокислотному составу и серологическим свойствам. Микроб также имеет ферменты патогенности — фибринолизин и гиалуронидазу.

Патогенез. Возбудитель проникает в организм воздушно-капельным путем или через поврежденную кожу (иногда слизистые оболочки). Инкубационный период длится 3–6 сут, иногда несколько часов, в ряде случаев 8–9 сут.

В зависимости от места локализации возбудителя, реактивности организма, вирулентности микроба, степени иммунитета развивается кожная, бубонная, кишечная, первично-септическая, вторично-септическая, первично-легочная, вторично-легочная формы болезни. Каждой форме болезни присущи специфические клинические признаки.

Лабораторная диагностика. Чума — высококонтагиозная инфекция, поэтому выделение и идентификацию ее возбудителя проводят в специальных противочумных лабораториях с соблюдением строгих мер предосторожности. Для диагностики применяют микроскопический, бактериологический и серологический методы. Мазки фиксируют полным погружением в жидкость Никифорова на 20 мин, остатки спирта сжигают. Обязательно окрашивают по Граму и на биполярность метилено-

вой синью по Леффлеру. Микроскопическое исследование имеет лишь ориентировочное значение.

Для подтверждения диагноза необходимо выделение чистой культуры. Материал засевают в МПБ, на МПА, агар и бульон Хоттинера. Культуры выращивают при 28–30°C в течение 12–24 ч.

Для дифференциации микроба ставят пробу с бактериофагом. Разработана также ускоренная реакция нарастания титра фага (РНФ) для ориентировочного диагноза чумы.

Биопробу ставят на белых мышках или морских свинках. Гибель животных, зараженных подкожно, наступает спустя 5–7 сут.

Серологические методы в основном используют для ретроспективной диагностики. Предложены РСК, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), нейтрализации антигена (РНАг) и нейтрализации антител (РНАт). При эпизоотическом обследовании чаще применяют РНГА. Для обнаружения антигена чумного микроба в организме животных рекомендуется реакция иммунодиффузии в геле.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У животных изучен недостаточно. Считают, что невосприимчивость индуцирует протективный антиген. Ведущее значение в антиинфекционном иммунитете при чуме принадлежит клеточной защите (Т-лимфоцитам).

Для профилактики чумы человека предложены живые и инактивированные вакцины. Наибольшее распространение получила живая вакцина из оригинального штамма EV. Эту же вакцину можно использовать для вакцинации верблюдов.

ВОЗБУДИТЕЛЬ КАЗЕОЗНОГО ЛИМФАДЕНИТА (ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА) ОВЕЦ

Казеозный лимфаденит — хронически протекающая инфекционная болезнь мелкого рогатого скота, характеризующаяся гнойно-некротическим воспалением соматических и висцеральных лимфатических узлов, а также органов и тканей. При этом наблюдается гематогенное рассеивание возбудителя с локализацией в органах, прежде всего в различных лимфатических узлах. Возбудителем является *Corynebacterium pseudotuberculosis*, который выделил при туберкулезоподобных из-

менениях у овец Претц (1891). Он относится к роду *Yersinia* из семейства *Euterobacteriaceae*.

Морфология. В гнойном содержимом очагов *C. pseudotuberculosis* проявляет заметный полиморфизм, присутствуя в палочковидной, овоидной и кокковых формах размером 0,6–1,0 мкм (рис. 33).

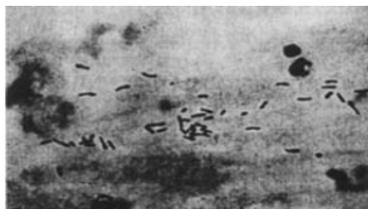


Рис. 33
Возбудитель
казеозного лимфаденита
(псевдотуберкулеза) овец
*Corynebacterium
pseudotuberculosis* $\times 1000$

Бактерии подвижны, имеют капсулу, спор не образуют, грамположительны, окрашиваются биполярно всеми анилиновыми красками.

Культивирование. *C. pseudotuberculosis* растет в аэробных и анаэробных условиях. Культивируется в МПБ и на МПА с добавлением 20% сыворотки крови, в элективных средах с теллуридом, хинозольной среде Бучина, кровяном или сывороточном теллуритовом агаре.

Посевы инкубируют при 37°C в течение 2–3 сут. На МПА развиваются колонии серо-белого цвета (R- или S-формы), на кровяном теллуритовом агаре — черные колонии с металлическим блеском. В МПБ образуется тонкая серо-белая пленка, которая при встряхивании легко ломается и оседает на дно пробирки, среда остается прозрачной; на дне — осадок в виде хлопьев и гранул.

Биохимические свойства. Среди различных культуральных форм (R-, S-) возбудителя могут быть варианты, ферментирующие глюкозу, галактозу, лактозу и сахарозу. Некоторые варианты образуют в жидкой среде (МПБ) сероводород и не вызывают гемолиз эритроцитов барана; вызывают свертывание молока и гидролиз желатина на 5–6-е сутки. Нитратотрицательные формы вызывают поражения у овец и коз, а нитратположительные — у лошадей и крупного рогатого скота.

Токсинообразование. *C. pseudotuberculosis* выделяет экзотоксин. Стабильное образование токсина отмечено в МПБ, мясопептонном легочном и бульоне из свежего желудка свиньи.

К токсину в разной степени чувствительны животные: морские свинки наиболее чувствительны к летальной дозе, а кролики — к внутрикожному введению в небольших дозах. Буль-

онные культуры, содержащие экзотоксин, вызывают гибель мышей через 48 ч после заражения. При вскрытии отмечают явления сильной интоксикации. У мышей, погибающих через пять дней и позже, — некротические очаги в органах и тканях.

Токсин под действием 0,4% -го формалина переходит в анатоксин.

Патогенез. Проникнув алиментарным или аэрогенным путем через поврежденную кожу или пуповину, бактерии оседают в регионарных лимфоузлах либо с током крови разносятся по всем тканям и органам, вызывая септицемию. В результате пиогенного и токсического действия возбудителя на организм происходит гнойное воспаление лимфоузлов, появляются гнойно-некротические фокусы в легких, печени, кишечнике, селезенке, матке, вымени и других органах, нарушается кровообращение, поражается центральная нервная система. Гибель наступает в результате асфиксии, сердечной недостаточности и кахексии.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопию, выделение чистой культуры, биопробу и гистологическое исследование. Патологическим материалом служат свежие не вскрытые инкапсулированные очаги, пораженные лимфатические узлы.

В лаборатории казеозный очаг освобождают от окружающих тканей и обеззараживают наружную поверхность капсулы фламбированием. Из гнойного содержимого готовят суспензию, из которой делают мазки и одновременно посев на питательные среды. Если в очаге содержится спрессованная казеозно-некротическая масса, то для микроскопии лучше готовить мазки-отпечатки. Выделяют чистую культуру возбудителя, изучают его биохимические свойства и проводят биопробу. К возбудителю казеозного лимфаденита наиболее чувствительны морские свинки, наименее — кролики. Самцов морских свинок заражают внутримышечно: при положительной реакции гибель наступает через 5–20 сут с образованием орхитов и перiorхитов.

Встречаются трудности при идентификации *C. pseudotuberculosis* человека и животных, поскольку они имеют ряд общих признаков.

Иммунитет. Наиболее изучен гуморальный иммунитет по сравнению с клеточным иммунитетом. Для специфической профилактики и терапии казеозного лимфаденита биопрепараты не разработаны.

14.7.5. ПАСТЕРЕЛЛЫ

ВОЗБУДИТЕЛИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА

Пастереллез (геморрагическая септицемия) — инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, в том числе птиц, характеризующаяся явлениями септицемии и воспалительно-геморрагическими процессами во внутренних органах, на серозных и слизистых оболочках.

Впервые возбудителя холеры кур в чистой культуре выделил Л. Пастер в 1880 г. Название *Pasteurella* возбудителю присвоено в честь ученого в 1910 г.

По современной классификации пастереллы объединены в секцию 5, семейство *Pasteurellaceae*, в котором один род *Pasteurella*. Род представлен шестью видами. Основные возбудители болезни — *Pasteurella multocida* и *Pasteurella gemolytica*.

Морфология. *P. multocida* в мазках-отпечатках из крови и органов представляют собой грамотрицательные короткие овоидные палочки (длиной 0,4–1,2 мкм и шириной 0,3–0,4 мкм). При окраске по Романовскому — Гимзе имеют вид биполяров (интенсивно окрашиваются по полюсам). В мазках из культур пастереллы имеют вид коккоовидных палочек, располагающихся одиночно, попарно, реже в виде коротких цепочек. Неподвижные, образуют слизистые капсулы, спор не образуют (рис. 34).

Культуральные свойства. *P. multocida* — факультативный анаэроб. Оптимум температуры 37–38°C, pH среды 7,2–7,4. Растут в МПБ и на МПА, но лучше, при внесении к ним сыворотки крови, на средах Хоттингера или Мартена. На МПА (S-формы) образуют мелкие, выпуклые, прозрачные, круглой формы колонии серого цвета, M-формы — более крупные слизистые колонии с непрозрачным центром; R-формы — шероховатые непрозрачные колонии. В косопроходящем свете колонии S-формы флюоресцируют, что связано с капсулообразованием; в МПБ — слабое равномерное помутнение среды и об-

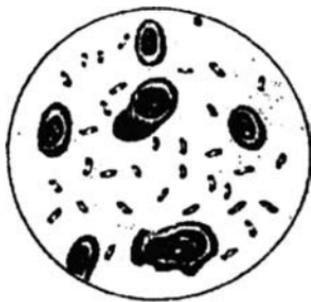


Рис. 34
Пастереллы

разование на дне пробирки слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде характерной косички. М-формы растут более интенсивно и дают более выраженный слизистый осадок. R-формы образуют хлопьевидный или зернистый осадок.

Пастереллы ферментируют с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит, не ферментируют лактозу, дульцит, аденит. Образуют индол, не разжижают желатин, на кровяном агаре не вызывают гемолиза, проба на каталазу положительная.

Антигенная структура. *P. multocida* имеет К-(капсульный) и О-(соматический) антигены. К-антигены разделены на четыре серологических типа: А, В, D и Е.

P. multocida серовара А (по Картеру) преимущественно поражает птиц, реже крупный рогатый скот и свиней, серовара В и Е вызывают острое заболевание домашних и диких животных, протекающее в виде геморрагической септицемии, серовар D встречается у всех видов животных.

Устойчивость. В окружающей среде невысокая. При 58°C погибают за 20 мин, при 90°C — за 10 мин, при кипячении — моментально. Выдерживают замораживание до -70°C. При высушивании на открытом воздухе гибнут за 2-3 сут. В почве выживают до 12 сут, в навозе — 14, птичьим помете — до 72 сут, в гниющих трупах — до 3 мес., в зерне — до 44 сут. Дезинфицирующие растворы в принятых концентрациях (раствор, содержащий 5% активного хлора, 3%-е растворы формальдегида и гидроксида натрия) убивают пастерелл в течение 10 мин.

Патогенность. Патогенные и вирулентные свойства пастерелл варьируют и наиболее сильно выражены у животных того вида, от которого они выделены. Эпизоотические штаммы высоковирулентны для белых мышей и кроликов. Установлена корреляция между вирулентностью, капсуло- и токсинообразованием. Наибольшей вирулентностью обладают свежвыделенные культуры. В лабораторных условиях при хранении культур вирулентность пастерелл резко снижается.

Патогенез. При остром течении болезни пастереллы быстро размножаются, проникают в кровеносную и лимфатическую системы, вызывая септицемию. За счет образования эндотоксинов и других агрессивных субстанций повреждаются стенки сосудов, они становятся проницаемы для плазмы, клеточных

элементов, развивается геморрагический диатез, появляются отеки подкожной и межмышечной клетчатки. В результате нарушения кровообращения наступает некроз тканей.

Диагностика. Для выделения пастерелл используют только свежий патологический материал от нескольких трупов больных животных. Для первичного выделения и культивирования пастерелл пригодны только обогащенные питательные среды, в том числе МПА, с 5–10% крови барана или лошади или сывроточный МПБ. Посевы из внутренних органов (кровь, печень, селезенка, легкие, трубчатая кость, головной мозг) и из мест поражения (лимфатические узлы, отечная ткань и др.) инкубируют в термостате при 37°C в течение 24–48 ч. Из патологического материала готовят мазки и окрашивают по Граму, Романовскому — Гимзе или синькой Леффлера.

Вирулентность выделенной культуры определяют путем постановки биологической пробы. Белых мышей или кроликов заражают культурой пастерелл, выделенной от крупного рогатого скота, свиней, овец, птиц (голубей, кур, уток). Белых мышей и кроликов заражают подкожно в дозе 0,2–0,5 мл суточной культурой пастерелл; голубей и 90–120-суточных цыплят — бульонной культурой в дозе 0,5 мл внутримышечно. Кроликов перед заражением исследуют на пастереллоносительство. С этой целью в течение трех дней до заражения им закапывают в носовые отверстия по две капли 0,5% -го водного раствора бриллиантовой зелени. Появление гнойного истечения свидетельствует о пастереллоносительстве. Этих кроликов не используют в опыте.

Для биопробы применяют также кровь или суспензию из паренхиматозных органов от павших животных. Через 24–48 ч после заражения культурой или исследуемым материалом подопытные животные погибают. На основании морфологии, культурально-биохимических свойств и биопробы ставят диагноз «пастереллез».

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных образуется нестерильный иммунитет. После вакцинации животные (особенно птицы) могут оставаться пастереллоносителями.

Для активной иммунизации применяют видоспецифичные эмульгированные вакцины отдельно для крупного рогатого ско-

та, буйволов и свиней; преципитированную вакцину — для овец и свиней; полужидкую — для крупного рогатого скота и буйволов; ассоциированную вакцину против пастереллеза, сальмонеллеза и диплококковой септицемии — для свиней. Для активной иммунизации птиц применяют инактивированные (эмульгированная для кур и уток, а также эмульсивакцина отдельно для кур, индеек, уток и гусей) и живые ослабленные вакцины (из пастеровского штамма для домашней птицы всех видов и две вакцины из штамма АВ и штамма К Краснодарской НИВС для водоплавающих птиц).

Для профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Пастереллы высокочувствительны к гентамицину, левомицетину, стрептомицину, тетрациклам и некоторым сульфаниламидным препаратам.

ВОЗБУДИТЕЛИ ГЕМОФИЛЕЗОВ

Возбудители гемофилезов включены в семейство *Pasteurellaceae*, род *Haemophilus*. Род насчитывает 16 видов, среди которых имеются патогенные для человека и животных. Это очень мелкие коккобактерии и палочки, облигатные паразиты слизистых оболочек, нуждающиеся в специфическом ростовом факторе, содержащемся в крови и в продуктах жизнедеятельности некоторых бактерий.

Возбудитель гемофилезного полисерозита. Гемофилезный полисерозит — инфекционное, септическое заболевание поросят послеотъемного периода, характеризующееся серозно-фибринозным воспалением плевры, перикарда, брюшины и суставов. Возбудитель болезни — *Haemophilus parasuis*.

Морфология. Мелкая, от 0,2 до 0,5 мкм длины, полиморфная палочка, неподвижная, грамотрицательная, образующая капсулу. В мазках из патологического материала возбудитель имеет вид коротких цепочек, диплобактерий и нитей. Спор не образует.

Культивирование. Для роста и развития возбудителя на искусственных питательных средах необходимо присутствие ростового фактора, содержащегося в крови и продуктах обмена некоторых бактерий. С этой целью готовят кровяной МПА (рН 7,2), содержащий 5% крови овцы; шоколадный агар

(к расплавленному 2%-му МПА при температуре 45–50°C добавляют 10% по объему стерильной дефибринированной крови барана), а также специальные среды — плотные и жидкие Левенталя и Файдля. Посев и пересев производят на подсушенную среду. После посева патологического материала или пересева культуры чашки выдерживают в термостате в течение 30 мин, затем с помощью бактериологической петли делают крестообразный посев культур негемолитического штамма кишечной палочки или белого стафилококка и методом штриха по диаметру чашки («баккормилка»). Гемофильные бактерии образуют рост в зоне 1–2 см от штриха, так как при росте кишечная палочка или стафилококк продуцирует в агаровую среду ростовые факторы, стимулирующие развитие гемофильной бактерии. Чашки инкубируют в термостате при 37–38°C в течение 24 ч, после чего просматривают культуры.

На кровяном МПА с «баккормилкой» вырастают мелкие (0,2–0,4 мм), выпуклые, с блестящей поверхностью колонии слизистой консистенции, без наличия зоны гемолиза. При росте в жидких средах с ростовыми добавками стафилококка гемофильные бактерии образуют умеренную опалесценцию и продуцируют эндотоксин. Гемолизин и уреазу не образуют. В мазках, приготовленных из колонии и окрашенных по методу Гинса, на темном фоне видны мелкие палочковидные (нитевидные) бактерии красного цвета, окруженные узкой светлой зоной (капсула).

Антигенная структура. Различают четыре серологических варианта *H. parasuis* — А, В, С и D. Болезнь чаще вызывают серовары А и D.

Патогенез. Изучен недостаточно. Полагают, что проникший возбудитель заносится кровью на серозные оболочки, где размножается, вызывая воспаление. В дальнейшем под влиянием протеаз микроб разрушается, освобождаются эндотоксины, которые усугубляют патологические процессы в организме.

Лабораторная диагностика. Для бактериологического исследования берут экссудат из перитональной, плевральной и перикардиальной полостей, а также соскобы с пораженных серозных оболочек в стерильные флаконы не позднее 4–6 ч с момента гибели животного. Патологический материал в термосе со льдом отправляют с нарочным. В лаборатории мазки отпе-

чатки после окраски по Граму и Гинсу микроскопируют, параллельно делают посевы на кровяной мясопептонный и шоколадный агары. Определяют патогенность выделенной культуры на морских свинках. Колонии, выросшие на шоколадном агаре, суспендируют в стерильном физиологическом растворе до 20 ед. мутности. Суспензию в дозе 1 мл вводят внутривентриально трем морским свинкам. Наблюдение ведут в течение 5 дней. Культуру признают патогенной в случае гибели одной морской свинки или более и выделения от них исходной культуры.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Изучены слабо. Применяют инактивированную вакцину (М. А. Сидоров с соавт., 1979) для иммунизации супоросных свиноматок и молодняка; для лечения — антибиотики.

Возбудитель гемофилезной плевропневмонии. Гемофилезная плевропневмония — инфекционная контагиозная болезнь свиней. Характеризуется при остром течении геморрагическим воспалением легких и фибринозным плевритом, при подостром и хроническом — развитием очаговой гнойной некротизирующей пневмонии и фиброзного плеврита. Возбудитель — *Haemophilus pleuropneumoniae*.

Морфология. Это мелкие (0,3–0,4 мкм) коккобактерии, обладающие выраженным тропизмом к легочной ткани, неподвижные, грамотрепетельные, образуют капсулу, спор не образуют.

Культивирование. *H. pleuropneumoniae* растет на кровяном, шоколадном и сыровоточном агарах с наличием «баккормилки» в аэробных условиях. В жидкой среде с ростовым фактором вызывает равномерное помутнение, продуцирует бета-гемолизины и уреазу. На кровяном МПА образует мелкие, гладкие, выпуклые, круглые с ровными краями колонии слизистой консистенции, окруженные зоной гемолиза. Хорошо растет на шоколадном агаре. На обычном МПА с «баккормилкой» формирует колонии только вблизи штриха питающей культуры.

Антигенная структура. Установлено десять серологических вариантов возбудителя, не отличающихся друг от друга по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, а только по капсульному антигену.

Патогенез. Изучен недостаточно. Полагают, что возбудитель, обладая тропизмом к легочной ткани, проникнув с выды-

хаемым воздухом в альвеолы и паренхиму легких, начинает там размножаться. Под влиянием микробов и выделяемых ими токсинов в месте размножения возбудителя образуются первичный очаг геморрагического воспаления и очаговый серозно-фибринозный плеврит, как правило, в центре диафрагмальной доли легкого. Первичный очаг может купироваться с образованием абсцесса или возбудитель из первичного очага проникает в кровь с последующим развитием септицемии и токсемии.

Лабораторная диагностика. Для исследования направляют кусочки пораженных легких, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы в термосе со льдом. Из материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и Гинсу и микроскопируют. Параллельно делают посев на предварительно подсушенный кровяной МПА в чашках. Чашки выдерживают в термостате в течение 24 ч, затем изучают характер роста.

Возбудителя плевропневмонии дифференцируют от возбудителя гемофильного серозита. В отличие от *H. parasuis* возбудитель плевропневмонии обладает гемолитической и уреазной активностью, образует сателлитные колонии на МПА с «баккормилкой», в МПА и на МПБ без «баккормилки» не растет.

Патогенность выделенной культуры определяют на белых мышах при внутрибрюшинном заражении.

Иммунитет. Изучен слабо. Для специфической профилактики предложена ГОА-формолвакцина. Вакцинируют супоросных свиноматок для создания колострального иммунитета.

14.7.6. ВОЗБУДИТЕЛИ БРУЦЕЛЛЕЗА

Бруцеллы — мелкие кокковидные или палочковидные грамотрицательные бактерии. Входят в секцию 4 (граммотрицательные аэробные палочки и кокки), род *Brucella*, который включает 6 видов: *B. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. melitensis* — овец и коз; *B. suis* — свиней; *B. canis* — собак; *B. neotomae* — кустарниковых крыс; *B. ovis* — инфекционного эпидидимита баранов. По антигенным и биохимическим свойствам подразделяют *B. abortus* на 9 биоваров, *B. melitensis* — на 3 и *B. suis* — на 5 биоваров.

Бруцеллы обнаружил в 1886 г. Д. Брюс, микроскопируя мазки из селезенки солдата, умершего от мальтийской лихо-

радки, а в 1887 г. он выделил чистую культуру и возбудителя назвал *Micrococcus melitensis*. Б. Банг и В. Стрибольт (1897) из околоплодной жидкости коровы выделили второй вид — *B. abortus bovis*, Траум (1914) от абортировавшей свиньи — третий вид — *B. abortus suis*. В 1920 г. К. Майер и М. Фезье объединили эти три микроба в одну группу и назвали бруцеллами в честь открывшего их Брюса.

Бруцеллы являются возбудителями бруцеллеза — хронической инфекционной болезни животных и человека, проявляющейся абортами, эндометритами, задержанием последа, орхитами, рецидивирующей лихорадкой, у лошадей — преимущественно бурситами в области холки и воспалением связок затылочного сустава. *B. ovis* вызывает эпидидимит у баранов, яловость, аборт и рождение нежизнеспособных ягнят.

Морфология. Бруцеллы — мелкие коккобактерии (0,3–0,6 мкм) или палочки (0,6–2,5 мкм), в окрашенных препаратах располагаются одиночно, парами и небольшими группами. Неподвижны, спор не образуют. Мукоидные и гладкие варианты синтезируют нежную капсулу. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, грамотрицательны. При окраске по Козловскому бруцеллы красные, другие микроорганизмы и фон препарата зеленого цвета (рис. 35).

Культивирование. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при 36–38°C и pH 6,8–7,2, однако для их культивирования используют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (МППБ), мясопептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГА), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГГБ, ПГГА) с 1% глюкозы и 2–3% глицерина, картофельный агар, сывороточно-декстрозный агар и др.

Бруцеллы *B. abortus* и *B. ovis* — микроаэрофилы, первые их генерации выращивают в условиях содержания 10–15% CO₂. Выделяемые из первичного материала бруцеллы растут очень медленно, в среднем 15–30 сут, старые лабораторные культуры вырастают уже через 24–48 ч.

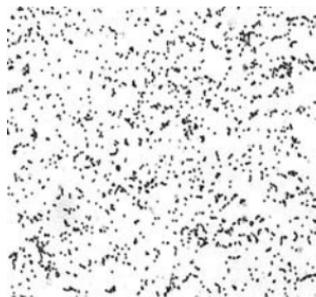


Рис. 35
Бруцеллы

Вирулентные типичные штаммы (S-форма) на поверхности агара образуют мелкие, 2–3 мм в диаметре, круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью и ровными краями, прозрачные с голубоватым оттенком колонии; в бульоне — слабое равномерное помутнение и пристеночное кольцо, в дальнейшем — небольшой осадок.

Авирулентные варианты (R-форма) на агаре образуют шероховатые колонии, в бульоне — неравномерное помутнение с просветлением и крошковатым осадком. На агаре с кровью бруцеллы гемолиза не дают, пигмент не синтезируют.

Биохимические свойства. Сахаролитическая активность у бруцелл выражена слабо. Они утилизируют углеводы, но не образуют кислоту и газ в количествах, достаточных для их идентификации. Нитраты редуцируют в нитриты. Молоко не свертывают, желатин не разжижают. Некоторые виды гидролизуют аминокислоты с образованием аммиака.

B. abortus и особенно *B. suis* при росте выделяют сероводород; *B. melitensis* образует его в незначительном количестве на средах с серосодержащими аминокислотами. Могут продуцировать каталазу, пероксидазу, липазу, фосфатазу.

Антигенная структура. Бруцеллы в S-форме трех основных видов обладают двумя соматическими антигенами: М (*melitensis*) и А (*B. abortus*). М-антигена у *B. melitensis* в 20 раз больше, чем у других видов, в небольшом количестве также имеется А-антиген; соотношение антигенов А и М у *B. abortus* составляет 20:1. *B. suis* содержит больше М-антигена, чем *B. abortus*. Предполагают, что эти антигены представлены сложным глицидолипидополипептидным комплексом. Они активно индуцируют синтез антител, выявляемых в реакциях преципитации, агглютинации, РСК и других. Особенности антигенной структуры бруцелл позволяют получить моноспецифические А- и М-антисыворотки. Кроме того, был обнаружен поверхностный L-антиген, сходный с Vi-антигеном сальмонелл.

Устойчивость. Бруцеллы малоустойчивы к действию различных физических и химических факторов. Агаровые культуры в запарафинированных пробирках сохраняются несколько недель, лиофильно высушенные — годами. Прямые солнечные лучи убивают их за 4,5 ч. В воде бруцеллы выживают более 5 мес., в поверхностном слое почвы — 40 сут, на глубине 5–8 см —

до 3 мес., в навозе при медленном высушивании — до 120 сут, в моче коров — до 4 сут, в почве зимой — 4–5 сут, в высушенных плодных оболочках — до 120 сут. В охлажденном молоке сохраняются 6–8 сут, в кислом молоке — 1–4, в масле — 40–60, в сырах — более 42, в брынзе (5–11% -й раствор поваренной соли) — 45–60, в замороженном мясе — свыше 320 сут, в засоленных шкурах — 2 мес., в шерсти — до 3–4 мес.

При температуре 60°C бруцеллы погибают через 30 мин, при 80–85°C — через 5 мин, при 100°C — мгновенно. Пастеризацию молока проводят при 85–90°C 30 мин.

Дезинфицирующие растворы — 2% -й фенол, 1% -й креолин, 0,5% -й лизол, 1–2% -й формалин, 0,5–1% -й хлорамин, 1% -я соляная кислота, 3% -й гидроксид натрия, 5% -я хлорная известь убивают бруцелл в течение нескольких минут.

Патогенность. Патогенное действие связано с образованием эндотоксинов, а также гиалуронидазы, каталазы, уреазы. Бруцеллы высокоинвазивны, могут проникать через неповрежденные слизистые покровы пищеварительного тракта, легких, глаз и кожу. Восприимчивы овцы, козы, крупный рогатый скот, буйволы, свиньи, лошади, мулы, верблюды, северные олени, собаки, кошки, многие дикие животные (лоси, косули, сайгаки и др.). Молодняк до половой зрелости более устойчив. Каждый вид бруцелл поражает животных определенного вида. Но бруцеллы могут мигрировать, заражая животных других видов, например, *B. melitensis* — крупный рогатый скот, свиней и лошадей, *B. abortus* — коз, овец, лошадей и свиней, *B. suis* — крупный и мелкий рогатый скот, лошадей. Для человека наиболее опасна *B. melitensis*.

Больные животные выделяют возбудителя с молоком, абортировавшим плодом, околоплодной жидкостью, влагалищной слизью, мочой, калом.

Из экспериментальных животных к бруцеллезу чувствительны белые мыши и морские свинки. У мышей после заражения иногда развивается септицемия, свинки abortируют, худеют, у них выпадают волосы, возникает генерализованная инфекция.

У многих животных через 1–2 г. наступает самовыздоровление.

Патогенез. Независимо от места внедрения в организм бруцеллы распространяются по лимфатическим путям и задержи-

ваются в регионарных лимфатических узлах, где размножаются, затем проникают в кровяное русло и попадают в паренхиматозные органы. Бруцеллы — внутриклеточные паразиты, обитающие в клетках лимфоидномacroфагальной системы. В местах их размножения образуются специфические гранулемы. При обострении процесса бруцеллы из клеток вновь проникают в кровь, вызывая различной интенсивности бактериемию и рецидив. В результате гибели бруцелл происходит освобождение эндотоксина, который обуславливает соответствующую симптоматику острого и хронического бруцеллеза.

Плодные оболочки многих животных содержат эритроген — фактор роста для бруцелл. Этим можно объяснить особенно высокую восприимчивость к инфекции беременных животных.

В патогенезе бруцеллеза определенное значение имеют L-формы бруцелл, которые длительное время персистируют в организме. При хроническом процессе от животных выделяли культуры бруцелл стабильных L-форм.

Лабораторная диагностика. Для диагностики бруцеллеза используют бактериологический, биологический, серологический и аллергический методы.

В лабораторию направляют абортированный плод с плодовыми оболочками или желудок плода с содержимым, кусочки печени, селезенки, содержимое гигром, абсцессов, молоко; от убитых животных — лимфоузлы, кусочки паренхиматозных органов, костный мозг, матку, яичники, семенники, вымя; от баранов — семенники с придатками. Для серологического исследования направляют кровь или сыворотку крови и молоко.

Бактериологическое исследование. Патологический материал высевают на ПГГБ, ПГГА, МППБ, МППГГА или сывороточный декстрозный агар. С целью подавления посторонней микрофлоры в среды можно добавлять генцианвиолет (1:200 000) или кристаллвиолет (1:100 000). При исследовании материала от крупного рогатого скота одну часть посевов инкубируют в атмосфере с содержанием 10–15% CO₂, другую — в обычных условиях. Для выделения культур *B. ovis* и *B. abortus* используют плотные или полужидкие печеночно-сывороточный или печеночно-аминопептидный агар при содержании 10–15% CO₂.

B. melitensis растет в обычных атмосферных условиях. Посевы инкубируют при 37–38°C в течение 30 сут.

Культуры бактерий, обладающие типичными морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами, дающие положительную РА с позитивной бруцеллезной сывороткой, относят к бруцеллам.

Виды бруцелл дифференцируют по способности роста в отсутствие повышенной концентрации CO₂, выделению H₂S, чувствительности к фагу Тб, бактериостатическому действию анилиновых красителей и агглютинации моноспецифическими сыворотками (табл. 6).

Биопроба. Осуществляют на морских свинках (не менее двух), сыворотка которых в разведении 1:5 отрицательно реагирует в РА с бруцеллезным антигеном. На 15-е, 25-е и 40-е сутки после заражения берут кровь, из которой получают сыворотку и исследуют ее в пробирочной РА в титрах от 1:10 до 1:80. Результат считают положительным, если сыворотка реагирует в титре 1:10 и выше. Для выделения культуры морских свинок убивают и делают посевы из лимфоузлов, селезенки, печени и костного мозга.

Серологические методы. Применяют пробирочную реакцию агглютинации (РА), реакцию связывания комплемента (РСК),

Таблица 6

Дифференциация бруцелл

Вид бруцелл	Потребность в CO ₂	Образование H ₂ S	Рост в средах с красителями		Агглютинация моноспецифическими сыворотками		Лизис фагом Тб
			Основной фуксин (1:50 000)	Тионин (1:25000)	А	М	
<i>B. melitensis</i>	–	–	+	–	–	+	–
<i>B. abortus</i>	+	+	+	–	+	–	+
<i>B. suis</i>	–	+	–	+	+	–	–
<i>B. ovis</i>	+	–	+	+	–	–	–
<i>B. neotomae</i>	–	+	–	–	+	–	–
<i>B. canis</i>	–	–	–	+	–	–	–

Примечание. «+» — интенсивный рост; «–» — отрицательный рост.

реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), пластинчатую реакцию агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба — РБП) и кольцевую реакцию с молоком (КР).

РА ставят в объеме 1 мл с единым бруцеллезным антигеном для РА, РСК и РДСК. Сыворотки крови овец, коз, буйволов, оленей и собак исследуют в разведениях 1:25, 1:50, 1:100, 1:200; крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов — 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400. РА считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов, начиная с разведения 1:100 (100 МЕ); овец, коз, буйволов, оленей и собак — с 1:50 (50 МЕ) с оценкой не менее чем два плюса. Сомнительной — при наличии агглютинации только в разведении 1:50 (50 МЕ) с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов и 1:25 (25 МЕ) — с сыворотками овец, коз, буйволов, оленей и собак с оценкой не менее чем два плюса.

РСК — специфичный и высокочувствительный метод диагностики бруцеллеза животных. Ее показания более постоянны и сохраняются дольше: комплементсвязывающие антитела появляются позже, чем агглютинины. Эта реакция позволяет выявить большее количество больных в стадах с давней инфекцией. РСК используют при диагностике бруцеллеза у вышеперечисленных видов животных, а также свиней.

РДСК — более чувствительный тест, чем РСК. При инфекционном эпидидимите баранов используют только РДСК с овисным антигеном. РСК и РДСК считают положительными при задержке гемолиза на 2–4 креста в одном или двух разведениях (1:5 или 1:10) и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена). Сомнительной — при задержке гемолиза с оценкой в один крест.

РБП используют для исследования сывороток крови крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, буйволов, верблюдов и оленей. Реакцию проводят при температуре 18–30°C с бруцеллезным антигеном, окрашенным бенгальским розовым, на пластинках с лунками. При положительной реакции в течение 4 мин появляются мелкие или крупные хлопья агглютината розового цвета.

КР ставят с цельным свежим или консервированным формалином молоком коров и антигеном — взвесью убитых бру-

целл, окрашенных в синий цвет гематоксилином. При наличии в молоке специфических антител происходит агрегация антигена, образовавшийся комплекс адсорбируется сливками молока и поднимается с ними вверх, образуя четкое, окрашенное кольцо. Проводится реакция в уленгутовских пробирках, в которые вносят по 0,05 мл антигена, добавляют 1 мл молока и содержимое тщательно смешивают, выдерживают при 37–38°C в течение 1 ч. Результаты учитывают визуально и оценивают:

- +++ — четко выраженное синее кольцо в верхней части молока, остальная часть молока белая;
- ++ — достаточно выраженное синее кольцо, столбик молока синеватого цвета.

Пробы, давшие реакцию с такими оценками, считают положительными. Эта реакция показательна для проверки благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота и молока на рынках.

Для выявления бруцелл непосредственно в патологическом материале, а также в объектах окружающей среды предложен прямой метод иммунофлюоресценции (РИФ); непрямой метод позволяет обнаружить антитела в сыворотке крови больных, переболевших или вакцинированных животных.

Аллергический метод. Для аллергической диагностики бруцеллеза овец, коз и свиней используют бруцеллин ВИЭВ, изготовляемый из неагглютиногенного и авирулентного штамма *B. abortus* В-1. У овец и коз применяют пальпебральную пробу, свиньям препарат вводят внутрикожно с наружной стороны ушной раковины. У животных, больных бруцеллезом, на месте введения бруцеллина развивается воспалительная реакция.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Противобруцеллезный иммунитет формируется медленно, в две фазы: 1-я — инфекционный, или нестерильный, иммунитет; 2-я — постинфекционный, или стерильный, иммунитет. Нестерильный иммунитет обусловлен присутствием возбудителя в организме.

В сыворотке крови больных животных накапливаются вначале IgM, затем IgG, а также неполные (IgA и IgG) антитела. Роль антител в механизме защиты при бруцеллезе неэффективна: присутствие их в организме не препятствует бактериемии. Но они имеют большое диагностическое значение. В первой фазе

отмечается угнетение макрофагальной реакции и фагоциты не способны переваривать бруцелл, что и приводит к диссеминации возбудителя по всему организму.

Иммунитет при бруцеллезе клеточный и обеспечивается Т-системой лимфоцитов. Для бруцеллеза характерно развитие гиперчувствительности замедленного типа (аллергия). Инфекционный иммунитет переходит в постинфекционный постепенно и сопровождается освобождением организма от возбудителя, в результате чего может наступить самовыздоровление.

Для специфической профилактики бруцеллеза предложены живые вакцины. Применяют живую вакцину из штамма 19 *B. abortus*. Этот штамм выделил в 1923 г. Бук, в процессе десятилетнего пассирования культуры на картофельном агаре, то есть был селекционирован иммуногенный мутант. Вакцинация профилактирует аборт и распространение бруцеллеза в стаде, однако сопровождается длительной серопозитивностью привитых животных, что не вполне удовлетворяет практику.

В России кроме указанной вакцины широко применяют сухую живую вакцину из слабоагглютиногенного штамма 82 *B. abortus* против бруцеллеза крупного рогатого скота; живую вакцину из штамма Рев-1 бруцелл вида мелитензис — против бруцеллеза мелкого рогатого скота. Во ВГНКИ разработана инактивированная адъювант-вакцина из штамма *B. abortus* КВ 17/100, которая создает напряженный иммунитет у крупного рогатого скота, не обладает реактогенными и абортотропными свойствами, не вызывая при этом образования S-агглютининов у вакцинированных животных, что важно для серологической диагностики.

14.7.7. ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ

Возбудитель туляремии — франциселлы — очень мелкие полиморфные бактерии. Входят в отдел *Cracilicutes*, секцию 4 (грамотрицательные аэробные палочки и кокки). Род *Francisella* представлен двумя видами, один из них — *Francisella tularensis* — патогенный. Этот вид вызывает природно-очаговую инфекционную болезнь животных — туляремию — характеризующуюся лихорадкой, параличами у молодняка, увеличением лимфатических узлов, абортами.

Бактерию туляремии выделили в 1912 г. Г. Мак-Кой и Ш. Чепин при изучении чумоподобного заболевания у сусликов в округе Туляре (Калифорния). Род *Francisella* назван в честь Э. Френсиса, впервые изучившего биологию этого микроба. Внутри вида *F. tularensis* различают три географические расы: голарктическую, среднеазиатскую и неарктическую, отличающиеся некоторыми биологическими особенностями.

Морфология. В окрашенных мазках возбудитель туляремии имеет кокковидную или палочковидную форму 0,3–0,7 мкм в длину и 0,2–0,4 мкм в ширину; встречаются более мелкие клетки (0,15 мкм и меньше), способные проходить через бактериальные фильтры. Кокковидные формы чаще находят в культурах, палочковидные — в организме животных. Для бактерии характерен полиморфизм, выявляемый при росте на питательных средах: в препаратах из культур наряду с типичными бактериями могут встречаться шаровидные и нитевидные формы.

Микроб неподвижен, спор не образует, имеет небольшую капсулу; в культурах продуцирует слизь, легко обнаруживаемую при изготовлении мазков.

Возбудитель окрашивается всеми анилиновыми красками, но заметно бледнее других бактерий, грамотрепательный. В мазках-отпечатках из органов павших животных хорошо красится по Романовскому — Гимзе, приобретая сиреневый цвет. В тканях бактерии биполярно не окрашиваются, чем и отличаются от пастерелл.

Культивирование. Бактерия не растет на универсальных питательных средах. Для ее культивирования применяют свернутую желточную среду Мак-Коя (60% желтка куриных яиц и 40% физиологического раствора). Используют также среду Френсиса (2,5% мясопептонного агара, 0,1% цистина, 1% глюкозы и 5–10% дефибринированной кроличьей крови), полужидкую желточную среду Дрожжевиной (10% куриного желтка и 90% стерильного физиологического раствора), кровяной рыбно-дрожжевой агар с глюкозой и цистином и др.

Туляремийная бактерия — строгий аэроб, оптимум температур 36–37°C, pH среды 7,2–7,0. На свернутой желточной среде при обильном росте микробы растут в виде блестящего тонкого налета с извилистой («шагреновой») поверхностью; при скудном росте вырастают небольшие блестящие выпуклые

колонии или группы колоний. На среде Френсиса культура имеет вид небольших (1–2 мм) круглых, выпуклых, гладких, блестящих, с ровными краями колоний беловатого цвета с голубоватым оттенком; рост отмечается через 2–3 сут. Колонии патогенных штаммов имеют S-форму. В жидких питательных средах туляремийный микроб растет значительно хуже (только на поверхности среды). Бактерии хорошо размножаются также в желточном мешке развивающегося куриного эмбриона.

Биохимические свойства. Бактерия туляремии не обладает выраженной биохимической активностью. Способность сбраживать углеводы и спирты ограничена и может быть достоверно выявлена лишь на специальных плотных средах с пониженным содержанием белка и с определенным рН. Среда Гисса для этой цели непригодна. Микроб ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, в ряде случаев — леулезу и маннозу; не сбраживает лактозу, сахарозу, рамнозу, маннит; образует сероводород и редуцирует тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Антигенная структура. Патогенные варианты возбудителя туляремии (S-форма) имеют два антигенных комплекса, локализованных на поверхности клетки. Первый из них — Vi-антиген — содержит липиды и белки, определяет вирулентность и иммуногенность микроба; второй — O-антиген — расположен в клеточной стенке и капсулоподобном слое бактерии, термостабильный гликопротеид. Оба эти комплекса обладают аллергенными и антигенными свойствами, индуцируют образование агглютинирующих, преципитирующих и комплементсвязывающих антител, а также гиперчувствительность замедленного типа. Функцию аллергена у этой бактерии выполняет полисахаридно-полипептидный комплекс. Vi-антиген патогенных вариантов возбудителя туляремии обладает сходством с аналогичным антигеном бруцелл.

Устойчивость. В воде или влажной почве при 4°C сохраняется без снижения вирулентности свыше 4 мес., в воде при 20–25°C — 10–15 сут, в зерне и соломе при температуре ниже 0°C — до 6 мес., при 8–12°C — 56 сут, при 20–30°C — не более 20 сут. В замороженном мясе возбудитель жизнеспособен до 93 сут, в молоке и сливках при 8–10°C — не менее 3 нед., в замороженном молоке — до 104 сут. В замороженных трупах

животных, павших от туляремии, — свыше 3 мес., в их шкурах при 8–12°C — более месяца, при 32–33°C — 1 нед. Микроб устойчив к высушиванию.

Особенно чувствителен к этиловому спирту (погибает через 0,5–1 мин). Чувствителен к дезинфектантам — лизолу, фенолу, креолину, но наиболее — к хлорной извести. Неустойчив ко многим антибиотикам — стрептомицину, левомицетину, тетрациклину, неомицину, канамицину; устойчив к пенициллину.

Патогенность. Бактерия патогенна для зайцев, полевок, домовых мышей, сусликов, крыс. Сельскохозяйственные животные относительно устойчивы к туляремии, заболевают спорадически, болезнь часто протекает в скрытой форме. Наиболее восприимчивы ягнята и поросята, болеют лошади, ослы. У крупного рогатого скота болезнь сопровождается увеличением лимфатических узлов и маститом. Чувствительны буйволы, верблюды, северные олени. Взрослые овцы устойчивы к заболеванию, еще более резистентны козы. Восприимчивы кролики, болезнь у которых протекает без характерных признаков и может иметь сходство с псевдотуберкулезом и хронической формой пастереллеза. Из птиц восприимчивы куры, особенно цыплята. К заражению чувствительны морские свинки и белые мыши.

Туляремией болеет и человек, однако заболевание протекает относительно доброкачественно и больной не представляет опасности для окружающих.

Истинный экзотоксин у этого микроба не выделен, но он синтезирует патогенные ферменты: аспарагиназу, гиалуронидазу, глутаминазу, дезаминазу, трансамидазу, уронидазу, фибринолизины. Уронидазу обнаруживают только у вирулентных штаммов. Считают, что патогенное действие туляремийного микроба в основном обусловлено эндотоксином.

Патогенез. Заражение происходит алиментарным, воздушно-пылевым и трансмиссивным путями. Бактерии могут проникать в организм через неповрежденные кожные покровы, конъюнктиву, дыхательные пути. Возбудитель, размножаясь на месте внедрения, сначала попадает в лимфатические узлы, затем проникает в кровь и вызывает септицемию. Симптоматический комплекс определяется видовой и возрастной устойчивостью животных, а также способностью возбудителя размножаться в органах, богатых ретикулоэндотелиальными элементами.

Лабораторная диагностика. При взятии, доставке в лабораторию и исследовании материала на туляремию соблюдают меры предосторожности, предусмотренные правилами работы с особо опасными инфекциями. Материалом для исследования служат печень, почки, селезенка, увеличенные лимфатические узлы, взятые от трупов крупных животных; трупы грызунов направляют целиком.

Схема исследования материала включает бактериоскопию, выделение чистых культур, биологическую пробу.

Мазки-отпечатки из органов животных окрашивают по Романовскому — Гимзе; учитывают большие скопления коккобактерий сиреневого цвета. Бактериоскопию следует рассматривать как ориентирующий метод.

Для индикации бактерий используют реакцию прямой иммунофлюоресценции, однако этот метод является сигнальным, и положительные результаты должны подтверждаться выделением культуры возбудителя. Для этой цели проводят посев патологического материала на специальных питательных средах (свернутая желточная среда Мак-Коя, среды Дрожевкиной и Емельяновой). Одновременно делают контрольные посевы на МПА и в МПБ, которые инкубируют в аэробных и анаэробных условиях при температуре 37°C. При обильном засеве рост туляремийных бактерий на свернутой желточной среде появляется в виде сплошного налета уже через 18–24 ч и достигает максимума через 2–3 сут; при скудном засеве отдельные колонии заметны на 3–5-е сутки и позднее. Поэтому засеянные среды рекомендуют инкубировать 10–14 сут. На среде Дрожевкиной микроб растет диффузно и наличие микробов контролируется микроскопическим исследованием мазков. Свежевыделенную культуру идентифицируют по морфологическим (неподвижные коккобактерии), тинкториальным (грамотрицательные бактерии) свойствам, характеру роста на свернутой желточной среде, отсутствию роста на универсальных питательных средах, а также по результатам пробирочной РА со специфической агглютинирующей сывороткой.

Биологическая проба. Самый чувствительный и надежный метод для обнаружения туляремийных бактерий в любом материале. Заражают белых мышей, реже морских свинок. Суспензию из кусочков органов и лимфатических узлов вводят в дозе 0,5 мл

подкожно или интраперитонеально или втирают в свежевыстриженный участок кожи. Белые мыши погибают через 3–4 сут, иногда через 8–12 сут, морские свинки — на 4–6-е сутки, при слабой инфицированности материала — в течение 8–20 сут.

Серологический диагноз. Осуществляют с помощью реакций агглютинации, преципитации, непрямой гемагглютинации и нейтрализации антител.

РА — достаточно точный метод исследования на туляремию. Антигеном служит туляремийный диагностикум, приготовленный из микробных клеток, убитых формалином. РА ставят двумя способами: пробирочным и кровяно-капельным. Диагностическими титрами при туляремии следует считать: для овец — 1:25, для крупного рогатого скота и свиней — 1:100.

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставят с эритроцитами, сенсibilизированными туляремийным антигеном или с антительным эритроцитарным диагностикумом. В первом случае его применяют для исследования сывороток сельскохозяйственных и диких животных на наличие специфических антител, во втором — для определения антигена в трупах животных. Реакция преципитации обладает относительно небольшой чувствительностью, и ее применяют в основном при исследовании трупов грызунов.

Аллергический метод. Гиперчувствительность замедленного типа у животных при туляремии развивается рано (до пятого дня болезни) и сохраняется длительное время, поэтому аллергический метод может быть использован для ранней и ретроспективной диагностики. Аллергеном служит тулярин; препарат вводят внутрикожно, реакцию учитывают дважды — через 24 и 48 ч.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных создается стойкий и длительный иммунитет, имеющий в своей основе тканевые и гуморальные механизмы. В сыворотках переболевших животных обнаруживают агглютинины, довольно рано формируются клеточные реакции защиты.

Для профилактической иммунизации человека применяют сухую живую вакцину против туляремии, предложенную в 1946 г. Н. А. Гайским и Б. Я. Эльбертом.

Для сельскохозяйственных животных вакцина не разработана.

14.7.8. ВОЗБУДИТЕЛЬ САПА

Сап — инфекционная болезнь цельнокопытных (лошадь, осел, мул), протекающая преимущественно хронически. В естественных условиях могут болеть также хищники семейства кошачьих, верблюды и человек.

Возбудитель — *Pseudomonas mallei* — был открыт в 1882 г. (Ф. Леффлером и А. Шютц). Он отнесен к семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*, виду *Pseudomonas mallei*.

Морфология. *Pseudomonas mallei* — прямая или слегка изогнутая палочка, 1–5 мкм в длину, 0,3–0,8 мкм в ширину, неподвижная, не образующая спор и капсул, граммотрицательная. При окраске по Романовскому — Гимзе и синью Леффлера выявляется зернистость. В культурах бактерии отличаются полиморфностью, вплоть до кокковидных форм.

Культивирование. Возбудитель растет на простых питательных средах при pH 6,8–7,2 с добавлением 2–4% глицерина. Температурный оптимум 37°C, при значениях ниже 20°C и выше 40°C не развивается, аэроб. На МПА с глицерином на вторые сутки появляется слизистый вязкий серовато-белый налет с перламутровым оттенком, который постепенно приобретает коричневый цвет. В МПБ с глицерином вначале отмечается равномерное помутнение среды и образование пристеночного кольца и слизистой пленки с последующим образованием слизистого серо-белого осадка. Дифференцирующей средой служит глицериновый картофель, на котором появляются мелкие полупрозрачные с желтоватым оттенком колонии в виде капелек, затем они сливаются, образуя слизистый медообразный налет. Цвет налета меняется от янтарно-желтого в первые дни до бурого-коричневого и красноватого к восьмому дню.

Возбудитель ферментирует глюкозу, лактозу без газа, не ферментирует мальтозу, маннит, сахарозу, индола не образует, желатин разжижает.

Антигенная структура. Установлено антигенное родство с псевдомонасами некоторых других видов, в том числе имеются антигенные детерминанты, общие для возбудителей сапа и мелиоидоза.

Устойчивость. В окружающей среде возбудитель малоустойчив. В воде и гниющем материале микроб гибнет через 1–30 сут,

при нагревании до 80°C — через 5 мин, при 100°C — мгновенно, солнечные лучи убивают его через сутки. Для уничтожения возбудителя во внешней среде используют хлорную известь с содержанием не менее 5% активного хлора, 4% -й раствор гидроксида натрия, 5% -й раствор лизола.

Патогенность и патогенез. Основным фактором патогенности служит эндотоксин. Значение других структур микробной клетки еще не изучено. Антигены микробной клетки вызывают гиперчувствительность замедленного типа. Из лабораторных животных чувствительны кошки, морские свинки и золотистые хомяки.

Возбудитель сапа, попав в организм, через лимфатические пути и кровь проникает в легкие и другие внутренние органы. В легких и паренхиматозных органах в месте локализации возбудителя формируются гранулемы. Клетки в центре узелка некротизируются, некротизированная масса обызвествляется, узелок обрастает фиброзной тканью. На слизистых оболочках носовой полости, глотки, трахеи и бронхов распадающиеся сапные узелки образуют язвы с изрытыми неровными краями и саловидным дном.

Лабораторная диагностика. Основной метод лабораторной диагностики сапа — серологический. Ставят РСК. В практике широко используют аллергический метод, основанный на применении маллеина (аллергический препарат для диагностики сапа). Маллеин предложили в 1891 г. независимо друг от друга ветеринарные врачи Х. И. Гельман и О. К. Кальнинг. Маллеин закапывают на конъюнктиву. Положительная реакция характеризуется воспалением конъюнктивы и истечением гнойного секрета из внутреннего угла глаза. В сомнительных случаях или при болезнях глаз применяют подкожную пробу. У зараженных животных повышается температура тела, в месте введения маллеина образуется болезненная припухлость.

Бактериологическое исследование проводят редко. Материалом для исследования служат пораженные органы, лимфоузлы, отделяемое язв. Из материала готовят суспензию и ставят биопробу на 2–3 золотистых хомяках или самцах морской свинки. Суспензию вводят подкожно в области шеи в дозе 0,5–1,0 мл золотистым хомякам и 3–5 мл морской свинке. На месте введения развивается процесс с формированием абсцессов. Гибель наступает через 1–2 нед.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при сапе клеточный, нестерильный, изучен слабо. В сыворотке крови зараженных животных появляются комплексы связывающие антитела, через 17–24 сут развивается гиперчувствительность замедленного типа.

Специфическая профилактика не разработана. Больных животных уничтожают.

14.7.9. ВОЗБУДИТЕЛЬ МЕЛИОИДОЗА

Мелиоидоз — сапоподобное заболевание, преимущественно септикопиемического характера.

Возбудитель мелиоидоза — *Pseudomonas pseudomallei*. Открыли его в 1911 г. в Рангуне А. Уайтмор и К. Кришнасами. Включен в семейство *Pseudomonadaceae*, род *Pseudomonas*. В естественных условиях болеют грызуны. Восприимчивы лошади, обезьяны, собаки, мелкий рогатый скот, а также человек.

Морфология. Короткие палочки размером 0,8–1,5 мкм, подвижные (лофотрихи), граммотрицательные, располагаются одиночно или в виде коротких цепочек. Спор и капсул не образуют.

Культивирование. Бактерия растет на обычных питательных средах при рН 6,8–7,2. Оптимальная температура 37°C. На МПА образуются вначале гладкие колонии, затем они становятся шероховатыми и плоскими, через 4–7 сут появляется желтовато-коричневый пигмент. На картофельной среде — обильный налет кремового цвета.

Культуры ферментируют с образованием кислоты лактозу, глюкозу, мальтозу, маннит и дульцит. Желатин разжижают, сероводород образуют, индола не образуют.

Антигенная структура. Возбудитель имеет Н-антиген, который характерен для данного возбудителя, О-антиген является общим с антигенами возбудителя сапа. Выявлены также К- и М-антигены, которые препятствуют агглютинации О-сывороткой.

Устойчивость. В почве и воде бактерия сохраняется до 40 сут, в моче — 17, в трупах грызунов — 8 сут, быстро погибает при кипячении; 1% -й раствор фенола и 0,1% -й раствор формалина убивают ее в течение 24 ч.

Патогенность. Основной фактор патогенности — эндотоксин; свежeweделенные штаммы образуют гемолизин, а продук-

ты гидролиза возбудителя обуславливают ГЗТ. При заражении лабораторных животных возникает септицемия с образованием множественных абсцессов в легких, печени, селезенке и лимфатических узлах, у самцов морских свинок — орхиты.

Патогенез. Возбудитель попадает в кровь через кожные покровы, органы дыхания или желудочно-кишечный тракт, где происходит размножение. В местах обитания микробы выделяют токсины, которые повреждают клетки и вызывают их некроз. В поврежденных органах возникают мелкие некротические очажки, которые в дальнейшем подвергаются казеозному распаду, а также абсцессы в регионарных лимфоузлах и мышцах. На коже и слизистых оболочках образуются мелкие узелки и гноящиеся язвы, развивается септикопиемия и животное погибает.

Лабораторная диагностика. Основана на исследовании патматериала с целью выделения чистой культуры возбудителя болезни.

Иммунитет. При мелиоидозе изучен слабо. В крови больных животных обнаруживают комплементсвязывающие и агглютинирующие антитела.

Средства специфической профилактики отсутствуют.

14.8. ИЗВИТЫЕ БАКТЕРИИ

14.8.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Кампилобактериоз — инфекционная болезнь крупного рогатого скота, овец, свиней, домашних и диких птиц, комнатных животных (собак, кошек и др.). У млекопитающих отмечают аборт, временное бесплодие, задержание последа, вагиниты, метриты, рождение нежизнеспособного молодняка, тяжелые кишечные заболевания; у кур — снижение прироста массы бройлеров, яйценоскости кур-несушек и падеж цыплят. Эта болезнь регистрируется во всех странах мира.

Впервые возбудитель был выделен в 1909 г. в Англии от абортировавшей овцы и в 1913 г. от абортировавшей коровы. Болезнь была названа вибриозом (Смит и Тейлор, 1919), а возбудитель вначале получил название *Vibrio fetus*. У нас в стране кампилобактериоз (вibriоз) впервые установил В. Л. Якимов (1926),

а позднее Е. В. Козловский (1938). От людей кампилобактерии были впервые выделены в 1947 г. Винзентом и др. Позднее многими исследователями было установлено, что отдельные виды кампилобактерий (*C. jejuni*, реже *C. coli*, *C. laridis*) могут вызвать у человека тяжелые диарейные и другие заболевания.

Кампилобактеры отнесены к семейству *Spirillaceae* и выделены в род *Campylobacter*. Выделено и описано 15 видов и подвигов кампилобактерий (*греч.* *kampylos* — изогнутый, *bakterion* — палочка), но не все они патогенны для животных и человека.

Основные виды: *C. fetus intestinalis* и *C. fetus venerealis*, *C. jejuni*, *C. sputorum* (подвиды *C. sputorum sputorum*, *C. sputorum bubulus*, *C. sputorum mucosalis*), *C. coli*, *C. fecalis*, *C. laridis*.

Морфология. Кампилобактеры — полиморфные, тонкие, изогнутые палочки в виде запятой, летящей чайки, буквы V, спирали с одним или несколькими завитками, длиной 0,5–8 мкм и толщиной 0,2–0,5 мкм. В старых культурах бактерии сферической или кокковидной формы. Подвижные, имеют один или два полярно расположенных жгутика (до 15 мкм); движение винтообразное. Капсул и спор не образуют (рис. 36).

Грамотрицательные, спиртово-водные растворы анилиновых красителей воспринимают с трудом; окрашиваются разведенным 1:5 карболовым фуксином Циля.

Культивирование. Бактерии относятся к микроаэрофилам, хотя отдельные штаммы могут расти и в анаэробных условиях. Оптимальные условия роста: наличие газовой смеси, состоящей из 5–6% кислорода, 10% CO₂ и 85% азота; температура 42–43°C и рН среды 7,2–7,3. Для получения культур возбудителя кампилобактериоза используют полужидкий 0,15–0,2% -й мясопеченочный агар (МППА), приготовленные на основе экстракта мышц сердца крупного рогатого скота железозентеритный агар (ЖЭКА), сафранино-железеновобиоциновую среду (СЖН), готовую сухую среду — кампилобакагар.

К стерильным средам добавляют 5% дефибринированной лизированной крови барана, крупного рогатого скота и лошади.

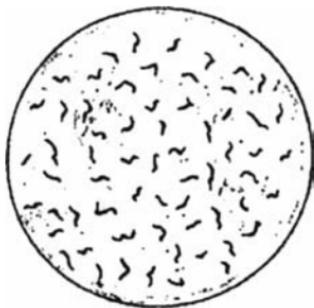


Рис. 36
Campylobacter

На ПЖА через 1–2 сут появляется рост в пробирке около самой поверхности среды в виде серовато-голубоватого диска толщиной от 1 до 4 мм; на плотной среде кампилобактеры образуют нежный мелкокоросинчатый, приобретающий затем серовато-белый цвет налет или отдельные серо-голубоватые колонии; на СЖН при росте чистой культуры розовый цвет среды не изменяется, при смешанном росте или размножении только других видов микробов среда становится ярко-желтой.

Биохимические свойства. Кампилобактеры не ферментируют углеводы и мочевины, дезаминируют глутаминовую и аспарагиновую кислоты, оксидазоположительны, индол не выделяют. Образуют сероводород, за исключением подвида *C. fetus venerealis*. Желатин не разжижают, молоко не свертывают, не вызывают гемолиза на средах с кровью. Реакции с метиловым красным и Фогеса — Проскауэра отрицательны. Подвиды *C. fetus* синтезируют каталазу и не редуцируют нитраты. Кампилобактерии имеют О-, Н- и К-антиген, белковой и полисахаридной природы, термостабильные и термолабильные энтеротоксины.

Антигенная структура. В антигенном отношении кампилобактеры неоднородны: они четко дифференцируются в реакциях агглютинации и непрямой гемагглютинации. Для их типирования приготовлены моноспецифические сыворотки.

У *C. jejuni* выявлено 25 сероваров; 1, 2 и 3-й — наиболее частые возбудители кампилобактериоза человека. Антигенный состав подвидов *C. venerealis* и *C. fetus* изучен недостаточно, однако у них установлены серовариантные различия. Выявлена также антигенная связь кампилобактеров с бруцеллами.

Устойчивость. В сене, подстилке, навозе, почве, воде кампилобактеры остаются жизнеспособными при 13–27°C до 20 сут, при 6°C — до 1 мес.; в гниющем материале разрушаются быстро. К замораживанию устойчивы: в инфицированных тканях матки и плодов при температуре — 20°C сохраняются 5–8 мес. Высушивание их убивает через 3 ч, при 55°C гибнут в течение 10 мин.

Растворы едких щелочей, хлорной извести, свежегашеной извести в концентрациях, применяемых для дезинфекции, убивают их за 5–10 мин.

Патогенность. В естественных условиях кампилобактериозом болеют: крупный рогатый скот, овцы, реже козы, свиньи,

домашние и дикie птицы, дикie животные. Основной возбудитель кампилобактериоза крупного рогатого скота — подвид *C. venerealis*, овец — *C. fetus*. От крупного рогатого скота также выделяют подвид *C. fetus*, *C. jejuni* и сапрофитный подвид *C. bubulus*. Описаны случаи диареи у молодняка и взрослых животных разных видов — коров, овец, коз, свиней и собак, вызванные *C. jejuni*. Заболевание свиней могут обусловить подвиды *C. venerealis* и *C. mucosalis*. У кур чаще всего обнаруживают патогенные *C. jejuni*.

У человека болезнь вызывает штамм *C. jejuni*, протекает она как острое желудочно-кишечное заболевание. Имеются сообщения о выделении подвидов *C. venerealis* и *C. fetus*. Установлено, что патогенность *C. jejuni* связана с действием эндотоксина, термолабильного и термостабильного энтеротоксинов.

К экспериментальному заражению культурами видов и подвидов кампилобактерий, вызывающих поражение мочеполовых органов, восприимчивы только беременные животные: овцы, козы, морские свинки, хомяки. Материал им вводят подкожно, внутривентрально, интравагинально или орально. Возбудители диарейных заболеваний животных (*C. jejuni*, *C. coli*) легко вызывают экспериментальную инфекцию при оральном заражении.

Патогенез. У быков возбудитель кампилобактериоза локализуется в слизистой оболочке препуциальной полости и уретры, семенниках, их придатках, длительное время сохраняется и выделяется со спермой. Попав во влагалище коровы, кампилобактеры размножаются и проникают в матку, вызывая воспалительные процессы (вагинит, эндометрит). В результате оплодотворенная яйцеклетка не приживается, или же в самом начале развития эмбрион гибнет. Если эмбрион продолжает развиваться, кампилобактеры внедряются в материнскую плаценту и плодные оболочки, что приводит к воспалению, нарушению плацентарного кровообращения и в итоге к аборту.

Овцы заражаются алиментарно; возбудитель гематогенным путем попадает в матку беременных животных и вызывает воспаление, аборт.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют абортированный плод с оболочками или голову, желудок, печень, легкие плода, часть плаценты; от коров — слизь из шей-

ки матки или цервикально-вагинальной области; от быков — препуциальную слизь, сперму, секрет придаточных половых желез; от убитых с диагностической целью животных — матку, яичники, влагалище, лимфоузлы тазовой полости, при поражении желудочно-кишечного тракта — содержимое слепой кишки и тонкого кишечника.

Лабораторные методы диагностики кампилобактериоза включают микроскопию, получение культур и их видовую идентификацию, при необходимости — серологическую типизацию выделенных культур.

Микроскопия: мазки окрашивают по Граму разведенным 1:5 фуксином Циля 1–2 мин. При положительном результате в препаратах обнаруживают типичные по морфологии кампилобактеры.

Выделение культур: исследуемый материал высевают в чашки с ПЖА, СЖН или другие селективные среды (лучше сеять одновременно на две среды). Чашки помещают в микроанаэростат с 10–15% CO₂, инкубируют при 42°C в течение 2–3 сут, просматривая их каждый день. Первичные культуры часто бывают загрязнены посторонней микрофлорой, поэтому с целью избавления от нее применяют плотные селективные среды, содержащие ингибиторы роста посторонней микрофлоры.

Дифференциацию *C. fetus* и *C. sputorum*, выделенных от животных, проводят по культуральным, биохимическим и серологическим свойствам возбудителя (см. табл. 7).

Серологическую идентификацию культур осуществляют со стандартными моноспецифическими сыворотками, ориентировочно в пластинчатой РА и окончательно в пробирочной РА.

Для обнаружения и идентификации возбудителей кампилобактериоза в культурах и патологическом материале применяется также прямой метод реакции иммунофлюоресценции с бивалентной (к сероварам венералис и фетус) и моновалентной (к серовару бубулюс) люминесцирующими сыворотками.

Серологическое исследование. Серологическая диагностика кампилобактериоза у коров проводится при помощи реакции агглютинации с вагинальной слизью (РАВС), а у овец — РА с сывороткой крови.

Вагинальную слизь берут марлевым тампоном, который помещают в пробирку с формализованным 3%-м раствором

**Тесты для видового дифференцирования культур
серваров кампилобактерий**

Тесты	Серовары			
	<i>C. fetus venerealis</i>	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. sputorum bubulus</i>	<i>C. jejuni</i>
Ферментация: оксидазы каталазы	+ +	+ +	+ —	+ +
Гидролиз гипсурата натрия	—	—	—	+
Сероводород в пробе со свинцово-ацетатными	—	—(±)	+	—
Редукция 0,2% селенита натрия на альбумин-агаре	—	+	+	+
Рост на ПЖА: с 0,15% агара с 8–10% желчи с 1% глицина с 3,5% хлористого натрия	Кольцо под по- верхно- стью + — —	Кольцо над по- верхно- стью + + —	Диффузный или кольцо под поверх- ностью — + —	 — — —
Типирование моноспецифическими сыворотками: <i>C. fetus venerealis</i> <i>C. fetus fetus</i> <i>C. sputorum bubulus</i>	+ — —	— + —	— — +	— — —

Примечание: «+» — наличие роста, или положительная реакция; «—» — отсутствие роста, или отрицательная реакция; «±» — сомнительная реакция.

хлористого натрия. Тампон отжимают пинцетом и жидкость центрифугируют. Супернатант разводят 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400. Реакцию ставят с кампилобактериозным антигеном. Оценивают по 4-балльной системе: положительная — хорошо выраженная агглютинация (++++ или +++) во всех четырех пробирках или только в первой и второй; сомнительная — агглютинация (++ или +) в первой и во второй пробирках; отрицательная — отсутствие агглютинации во всех пробирках (—).

РА с сывороткой крови овец ставят в разведениях 1:100, 1:200 и 1:400. Результат считают положительным, если испытуемые сыворотки в разведении 1:200 и выше дают агглютина-

цию в четыре или три креста, сомнительным — четыре или три креста в разведении 1:100 или два или один крест в разведении 1:200, отрицательным — агглютинация отсутствует или не выше ++ или + в разведении 1:100.

Овец, привитых вакциной против кампилобактериоза, не подвергают серологическому исследованию.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие кампилобактериозом животные приобретают стойкий иммунитет; повторные аборт не наблюдают. Иммунитет гуморальный: в сыворотке крови выявляются специфические антитела. Не исключается клеточно-зависимый иммунитет, обусловленный Т-лимфоцитами.

Для активной профилактики применяют эмульсинвакцины против кампилобактериоза крупного рогатого скота и овец, а также ассоциированные вакцины против кампилобактериоза, лептоспироза, сальмонеллеза и других инфекций.

14.8.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспироз — инфекционная природно-очаговая болезнь животных и человека, характеризующаяся кратковременной лихорадкой, анемией, желтухой, гемоглинурией, геморрагическим диатезом, некрозом слизистых оболочек и кожи, атонией органов пищеварения, абортами. Болезнь может протекать бессимптомно.

Возбудителя открыли японские ученые Р. Инада и У. Идо в 1914 г.

Лептоспиры относят к семейству *Leptospiraceae* (греч. leptos — тонкий, spira — виток, спираль) и роду *Leptospira*, который включает два вида: патогенный — *L. interrogans* и сапрофитный — *L. biflexa*. Патогенный вид представлен 183 сероварами, которые по составу антигенов объединены в 25 серологических групп.

В инфекционной патологии животных наибольшее значение имеют серогруппы *Pomona*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*.

Морфология. Лептоспиры — спиралевидные бактерии диаметром 0,1–0,25 мкм и длиной от 6–15 до 30 мкм, образующие около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков и

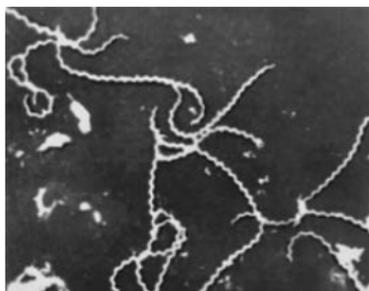


Рис. 37
Лептоспиры.
Микроскопия в темном поле

1–2 вторичных, придающих клетке форму букв Г, S, С. Осевая нить состоит из двух фибрилл. В темном поле они имеют вид тонких серебристых нитей с утолщенными и загнутыми в виде крючков концами (рис. 37).

У клеток некоторых штаммов концы прямые (бескрючковые лептоспиры).

Для лептоспир характерна активная подвижность, наиболее частый тип движения — вращательно-поступательный. Спор не образуют. Грамотрицательные, плохо окрашиваются анилиновыми красителями, по Романовскому — Гимзе — в красный цвет, фиксация мазка существенно изменяет их морфологию; используют также метод импрегнации серебром по Левадиту.

Культивирование. Лептоспиры — хемоорганотрофные факультативно-анаэробные бактерии. Культивируют их в аэробных условиях при 28–30°C на специальных средах, содержащих 5–10% сыворотки крови кролика или овцы, дистиллированную, водопроводную, колодезную воду или фосфатный буфер (рН 7,2–7,6): среды Уленгута, Терских, Ферворта-Вольфа, Любашенко и др. Рост лептоспир обычно проявляется через 7–20 сут, иногда через 1–2 мес. Среда при этом не изменяется. На плотных средах (Жюкса, ВГНКИ) образуют колонии S-, O- и R-форм. S-форма — типичная для патогенных штаммов, ее колонии прозрачные, в виде диска с ровным краем.

Биохимические свойства изучены недостаточно. Способность ферментировать углеводы отсутствует, образуют каталазу, оксидазу, липазу и другие ферменты.

Токсинообразование. Истинный экзотоксин лептоспиры не синтезируют. Они образуют эндотоксин и патогенные ферменты: гемолизин, фибринолизин, плазмокоагулазы, гиалуронидазы, липазы, лецитиназу, которые выделяются в результате лизиса лептоспир. Патогенностью обладают свежeweделенные штаммы лептоспир; при культивировании на питательных средах это свойство относительно быстро теряется.

Антигенная структура. Лептоспиры обладают белковым соматическим антигеном, определяющим их видовую специфичность. Поверхностные полисахаридные антигены служат критериями групповой и серовариантной дифференциации. Антигенные свойства лептоспир изучают в реакции микроагглютинации и методом иммуноадсорбционного анализа.

Устойчивость. В воде открытых водоемов патогенные лептоспиры сохраняются более 7–30 сут; будучи типичными гидрофилами, в почве, перенасыщенной водой, выживают до 280 сут; в свежем молоке — 8–24 ч; в почках убитых животных при 0–4°C — до 28 сут; в замороженном мясе погибают через 10 сут. Чувствительны к действию поваренной соли: в засоленном (4,8% NaCl) мясе крупного рогатого скота погибают через 10 сут; в гипертоническом растворе поваренной соли (2,8%) — через 15 мин.

При кипячении погибают моментально, при 56–58°C — в течение 25–30 мин. Быстро гибнут при высушивании и под воздействием прямого солнечного света. Растворы (0,1% -й соляной кислоты, 0,5% -й фенола) инактивируют лептоспиры за 20 мин.

Патогенность. К лептоспирозу наиболее восприимчивы: крупный рогатый скот (серогруппы *L. pomona* и *L. hebdomadis*), свиньи (серогруппы *L. pomona* и *L. tarassovi*), овцы, лисицы, песцы, менее — лошади, козы, буйволы, верблюды, олени, ослы, собаки, кошки, куры. Болеет и человек. Основные носители лептоспир в природных очагах: серые и водяные полевки, ондатры, серые крысы, домовые мыши, землеройки.

К экспериментальному заражению наиболее чувствительны золитистые хомяки, крольчата-сосуны и молодые морские свинки.

Патогенез. Входными воротами возбудителя являются поврежденная кожа и слизистые оболочки. Патогенные лептоспиры благодаря активной подвижности преодолевают защитные барьеры организма и быстро проникают в кровь. Через 12 ч после заражения их обнаруживают в печени. Затем наступает генерализация инфекции (бактериемия), размножение и накопление лептоспир в печени, почках, надпочечниках, селезенке, легких, появляется лихорадка. Образовавшиеся антитела инактивируют лептоспиры, и происходит их элиминация из крови и

паренхиматозных органов. В почечных клубочках и канальцах лептоспиры недоступны воздействию антител, где они активно размножаются и выделяются с мочой.

Лизис лептоспир сопровождается накоплением токсических веществ, под действием которых повышается проницаемость сосудов, лизируются эритроциты, происходят кровоизлияния, развиваются гематурия и желтуха, поражается нервная система. Токсикоз может привести к гибели животного.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат: кровь (лучше брать на 3–5 сут болезни при повышенной температуре тела), моча, кусочки паренхиматозных органов, почка, транссудат из грудной и брюшной полостей, мочевой пузырь с содержимым, абортированный плод. Патологический материал отбирают не позже 2 ч после гибели животного. Мочу собирают при естественном мочеиспускании; в летнее время исследуется не позднее 3 ч после взятия.

Микроскопия: исследуют мочу, цитратную кровь, ткани. Суспензию из коркового слоя почки, печени; у плода — из всех органов. Микроскопию проводят в раздавленной капле с конденсором «темного поля». Типичные лептоспиры активно подвижны и имеют форму прямой или S-образной с загнутыми в виде крючков концами серебристо-белой нити. Лептоспир также можно обнаружить в срезах из органов после импрегнации серебром по методу Левадити.

Выделение культур: материал засевают по 1–3 капли в 3–5 пробирок со специальной питательной средой и инкубируют при 28–30°C в течение 3 мес. Лептоспиры начинают размножаться через 7–20 сут, иногда через 1–2 и очень редко — через 3 мес. Наличие роста определяют темнопольной микроскопией раздавленных капель на 3, 5, 7, 10-е сутки и далее через каждые 5 сут. При обнаружении размножения лептоспир делают пересев в 3–5 пробирок со свежей средой. Выделить культуры лептоспир удается не всегда.

Биологическая проба: метод более чувствительный, чем культуральный; проводится с целью выделения и очистки культур лептоспир, определения их вирулентности и дифференциации от сапрофитов.

Заражают 20–30-суточных золотистых хомячков и крольчат-сосунов в возрасте 10–20 сут. Каждую пробу испытывают на

двух животных; на 4–5-е сутки убивают первое, на 14–16-е сутки — второе, если оно не погибло раньше. Из сердца, печени и почек убитых или павших животных проводят посевы. Сыворотку крови убитого через 14–16 сут животного исследуют в реакции микроагглютинации (РМА) с лептоспирами 13 серогрупп. Положительная РМА в разведении 1:10 и выше указывает на наличие лептоспир в исследуемом материале.

Серологическое исследование: для серологической диагностики лептоспироза используют РМА и реакцию агглютинации (РА). Пробы крови берут на 5–7-е сутки болезни и при необходимости повторно через 7–10 сут. Следует учитывать, что антитела в крови у выздоровевших животных могут сохраняться до двух лет и более.

РМА ставят в лунках полистироловых пластин. В качестве антигенов используют живые 5–15-суточные культуры лептоспир 13–16-й серогрупп. Сыворотку исследуют с антигенами каждой серогруппы в разведениях 1:5, 1:10 и т. д. до титра. В лунки вносят по 0,1 мл разведенной сыворотки и 0,1 мл антигена. Контролем служит антиген с физиологическим раствором (по 0,1 мл). Пластины выдерживают при 30°C в течение 1 ч; результаты учитывают в препаратах раздавленной капли в микроскопе с конденсором темного поля. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании «паучков», состоящих из нескольких десятков или сотен бактерий. Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность. Оценивают реакции в крестах по 4-балльной системе: положительная — не менее чем ++ в разведении сыворотки 1:50 и выше, при отсутствии агглютинации в контроле.

РА проводят на стеклянной пластинке, на которую наносят каплю разведенной 1:100 исследуемой сыворотки и добавляют равное количество антигена. Лептоспирозные антигены для РА выпускают шести серогрупп (для каждой отдельно), представляющие собой концентрированную взвесь лептоспир в альбуминовой питательной среде. При наличии в сыворотке специфических антител наступает агглютинация. Оценка результатов производится в плюсах по 4-балльной системе. Положительной считают реакцию ++ и выше, сомнительной — +. Для выявления лептоспир в крови, моче, паренхиматозных

органах, в тканях абортированного плода, в воде и почве предложен иммунофлюоресцентный метод.

Иммунитет и средства специфической профилактики. После переболевания у животных формируется длительный и напряженный иммунитет. Он характеризуется серовариантной специфичностью, поэтому возможны реинфекции. Ведущее значение в невосприимчивости к лептоспирозу принадлежит антителам, и особенно IgG. Сыворотки иммунных животных обладают превентивными свойствами. Отмечается также длительное лептоспиросительство и вследствие этого инфекционный иммунитет.

Вакцинацию коров проводят за 1,5–4 мес., овец и свиноматок — за 1,5–2 мес. до родов, колостральный иммунитет продолжается у телят до 2,5 мес., у ягнят и поросят до 3 нед.

Для активной иммунизации применяют депонированную поливалентную вакцину ВГНКИ против лептоспироза животных. Вакцину выпускают в двух вариантах: первый — из штаммов лептоспир серогрупп помона, тарассови, иктерогеморрагия и каникола, второй — из серогрупп помона, тарассови, гриппотифоза и четырех сероваров группы гебдомадис. Иммунитет после вакцинации наступает через 14–20 сут и длится у молодняка до 6 мес., у взрослых животных — до одного года.

Для пассивной иммунизации и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных, которую получают из крови волов-продуцентов, иммунизированных культурами лептоспир. Иммунитет у животных, привитых сывороткой, сохраняется 10–14 сут.

14.8.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ ДИЗЕНТЕРИИ СВИНЕЙ

Дизентерия свиней — острая инфекционная болезнь, характеризующаяся геморрагической диареей и некротическим поражением толстых кишок; широко распространена во многих странах, в том числе и в России.

Дизентерию свиней вызывает спирохета *Treponema hyodysenteriae*, которую выделили от больных животных Харрисон и Глок (1972), а также Лончаревич (1973). Микроб относится к семейству *Spirochaetaceae* и роду *Treponema*.

Морфология. При микроскопии в темном поле трепонемы имеют форму подвижных нитей с ровными, правильно расположенными завитками и острыми концами. Перемещаются они поступательно, змеевидно. Морфологически различают три формы трепонем свиней: крупные — длиной до 20 мкм с 8–12 завитками, средние — 8–12 мкм с 6–8 завитками и малые — до 8 мкм с 3–4 завитками. Хорошо окрашиваются анилиновыми красками, грамотрицательные.

Культивирование. Анаэроб. Культивируется на специальных средах: трипсин-агар с 5% цитратной крови крупного рогатого скота; триптический соевый бульон с 10% сыворотки крови плода коровы и спектиномицина (400 мг/л); соевый агар с 5% крови крупного рогатого скота; МПБ (рН 7,4–7,6) с кусочками мелко нарезанной печени коровы, 50% асцитической жидкости и 1:5000 аскорбиновой кислоты.

Засеянные среды инкубируют в анаэробных условиях 4–8 сут. В чашке с трипсин-агаром и 5% крови на поверхности вырастают нежная пленка со следами эрозии или мелкие прозрачные колонии, вокруг которых образуется зона гемолиза шириной 3–4 мм. Некоторые мутанты дают крупные колонии с наличием зоны гемолиза. В препаратах микроскопически выявляются трепонемы.

Устойчивость. Возбудитель при 18°C сохраняется несколько недель, в замороженном материале не теряет активности более 60 сут; в навозной жиже при анаэробных условиях выживает длительный срок.

Для дезинфекции применяют 4% -й (70°C) раствор гидроксида натрия и 2% -й раствор формальдегида. Возбудитель чувствителен к осарсолу, спирамицину и тилозину.

Патогенез. Возбудитель в организм попадает алиментарным путем, достигает толстого кишечника, проникает в подслизистую ткань и размножается. Размножение микробов сопровождается разрушением клеток и освобождением токсических продуктов, под действием которых происходят морфологические и функциональные нарушения кишечника, что приводит к развитию дисбактериоза и геморрагическому гастроэнтериту. Следует отметить, что в данном процессе участвуют и другие микробы. Установлено, что патологические изменения в толстом кишечнике проходят следующие стадии:

- острое катаральное воспаление;
- геморрагически-дифтеритическое воспаление с отеком слизистой оболочки и отложением на ее поверхности фибрина;
- фибринозно-некротическое воспаление с образованием язв, с последующим после лечения их заживлением и рубцеванием.

Лабораторная диагностика. Материалом для прижизненной диагностики служат фекалии, для посмертной — слизистая оболочка большой ободочной кишки. Из них готовят суспензию. Время пригодности отобранного материала — не более 2–4 ч, при хранении на холоде — 6–8 ч.

Основной метод исследования — микроскопия с использованием фазового контраста или конденсора темного поля. У больных при микроскопии раздавленной капли в одном поле зрения обнаруживают 5–10 и более средних и крупных трепонем.

Одновременно исследуют фиксированные и окрашенные по Граму, Романовскому — Гимзе и фуксином Пфейффера препараты, в которых выявляют грамтрицательные микроорганизмы с характерной для трепонем морфологией. Разработан также прямой вариант реакции иммунофлюоресценции.

Биопроба: трепонемы хорошо размножаются в организме кролика и накапливаются в тестикулах. Фильтрат материала от больных свиней вводят кроликам внутрибрюшинно в дозе 5–7 мл. Через 7–10 сут берут пунктат и микроскопируют. При обнаружении трепонем кроликов убивают и подвергают исследованию (микроскопия, выделение культур).

Иммунитет. Непродолжительный, слабой напряженности. Биопрепараты не разработаны.

14.9. ПАТОГЕННЫЕ МИКОПЛАЗМЫ

Микоплазмы — мельчайшие свободноживущие прокариоты без ригидной клеточной стенки. Функцию клеточной стенки у них выполняет цитоплазматическая мембрана.

Микоплазмы характеризуются следующим комплексом признаков:

- полиморфизм клеток, состоящих из ветвистых, шаровидных, разной оптической плотности особей и мельчайших репродуцирующих элементов размером 100–450 нм;

- наружная цитоплазматическая трехслойная мембрана; выполняет большинство биосинтетических и регуляторных функций;
- геном представлен одной молекулой ДНК, формирующей кольцевую хромосому, реплицирующуюся полуконсервативным путем; нуклеотидный состав ДНК характеризуется низким содержанием гуанина и цитозина;
- множественные пути репродукции — почкование, сегментация ветвистых и цепочных форм, элементарные тельца, простое деление (интегральный способ);
- нуждаются для роста в стеролах (за исключением ахолеплазм) и нативном белке;
- на плотных средах формируют колонии с приподнятым центром, напоминающие яичницу-глазунью;
- нечувствительны к пенициллинам и другим антибиотикам, угнетающим синтез пептидогликанов клеточной стенки бактерий;
- вызывают гемадсорбцию, гемагглютинацию и лизис эритроцитов различного происхождения;
- четко выражены антигенные различия.

Уникальная особенность микоплазм заключается в их сходстве с L-формами бактерий по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам. Однако общепризнано, что они не имеют эволюционного родства.

Происхождение микоплазм остается невыясненным. Существует гипотеза, что микоплазмы, как наиболее просто организованные прокариотные организмы, являются предками современных бактерий на пути прогрессивной эволюции. Другая гипотеза допускает, что микоплазмы произошли от соответствующих бактериальных форм аналогично тому, как осуществляется переход от бактерий к L-формам. Рассматривают также микоплазмы в качестве возможных предшественников эукариотов.

Этиологическое значение микоплазм в патологии животных было установлено впервые при контагиозной перипневмонии крупного рогатого скота Э. Нокаром и Э. Ру (1893). Они изолировали из плеврального экссудата больных животных фильтрующийся агент и разработали способ его выращивания в мартеновском бульоне с сывороткой крови. Микоплазмы изучали многие ученые из разных стран. Русские ученые М. Г. Тартаковский

и Е. П. Джунковский в начале XX столетия разработали эффективный метод культивирования возбудителя контагиозной перипневмонии крупного рогатого скота и изучили его биологию.

Классификация. Микоплазмы отнесены к отделу *Tenericutes*, классу *Mollicutes* (лат. mollia — мягкий, cutes — покров, кожа), порядку *Mycoplasmatales*, который состоит из трех семейств: микоплазм (*Mycoplasmataceae*), ахолеплазм (*Acholeplasmataceae*) и спиролазм (*Spiroplasmataceae*).

Семейство микоплазм включает два рода: микоплазмы (*Mycoplasma*) и уреаплазмы (*Ureaplasma*). Все представители рода микоплазм стеролозависимые и нуждаются для роста в экзогенном холестерине, не гидролизуют мочевины. Род включает 64 вида, среди которых имеются и патогенные (табл. 8).

Т а б л и ц а 8

Патогенность микоплазм

Род, вид	Основной хозяин	Болезнь
<i>M. mycoides</i> <i>subsp. mycoides</i>	Крупный рогатый скот	Контагиозная перипневмония
<i>M. mycoides</i> <i>subsp. capri</i>	Козы	Плевропневмония
<i>M. bovis genitalium</i>	Крупный рогатый скот	Маститы, воспаление гениталий
<i>M. bovis</i>	—«—	—«—
<i>M. bovirhinis</i>	—«—	Бронхопневмония телят
<i>M. dispar</i>	—«—	Бронхопневмония, артриты
<i>M. bovoculi</i>	—«—	Конъюнктивиты
<i>M. alcalescens</i>	—«—	Маститы
<i>M. agalactiae</i>	Овцы, козы	Агалактия овец и коз
<i>M. ovipneumoniae</i>	—«—	Пневмония
<i>M. hyorhinis</i>	Поросята	Полисерозит, полиартрит
<i>M. hyosynoviae</i>	—«—	Артрит
<i>M. hyopneumoniae</i>	Поросята, свиньи	Пневмония
<i>M. canis</i>	Собаки	—«—
<i>M. felis</i>	Кошки	Респираторные болезни
<i>M. neurolyticum</i>	Мыши	Поражение ЦНС

Род, вид	Основной хозяин	Болезнь
<i>M. pneumoniae</i>	Человек	Первичная атипичная пневмония, острые респираторные заболевания
<i>M. hominis</i>	—«—	Фарингиты, острые респираторные заболевания
<i>M. gallisepticum</i>	Птицы	Респираторный микоплазмоз
<i>M. meleagridis</i>	Индейки	Инфекционный синусит
<i>M. synoviae</i>	Куры, индейки	—«—
<i>M. anatis</i>	Утята	—«—
<i>U. urealyticum</i>	Различные виды животных, человек	Хронические воспалительные процессы урогенитальных органов. Патология плода
<i>A. laidlaw</i>	Приматы, крупный рогатый скот, лошади, свиньи, собаки, кошки, птицы	Респираторные болезни, урогенитальная патология, маститы
<i>A. granularum</i>	Свиньи, человек	Респираторные заболевания

Род уреаплазм представлен двумя видами. Это стеролозависимые, гидролизующие мочевины уреалитические микоплазмы, образующие мелкие колонии. Оптимум их роста находится в диапазоне pH 6,0–7,0, жизненный цикл составляет 16–18 ч. Они растут в виде мельчайших колоний диаметром 20–25 мкм. Типичный представитель — *Ureaplasma urealyticum*.

Семейство ахолеплазм объединяет стеролонезависимые, т. е. не нуждающиеся в холестерине, микроорганизмы. Описан один род — *Acholeplasma*, включающий 9 видов. Типичные представители рода — *A. laidlawii*, *A. granularum*.

Семейство спироплазм (стеролозависимые) имеет один род — *Spiroplasma* с 3 видами. Микоплазмы вызывают заболевания грызунов и цыплят. Выделяют от клещей и насекомых.

Морфология. Микоплазмы — исключительно полиморфные микроорганизмы, что обусловлено отсутствием у них ригидной клеточной стенки. В мазках из пораженных органов и

из культур они имеют форму подковообразных, сферических, нитевидных, овоидных, палочковидных или напоминающих кольца образований. Преобладание тех или иных форм определяется составом среды, методом культивирования, фазой роста, способом фиксации и окраски препаратов.

Данные о размерах микоплазм разноречивы, но они варьируют в пределах 120–1400 нм. Мелкие жизнеспособные элементы принято называть минимальными репродуцирующими единицами (элементарные тела), их размеры около 75–250 нм. Существуют морфологические элементы микоплазм, видимые в световом микроскопе, и структуры за пределами разрешающей способности этого микроскопа. Микоплазмы грамотрицательны, хорошо окрашиваются по Романовскому — Гимзе; для витальной окраски применяют специальный метод Динеса.

Ультраструктура микоплазм напоминает субмикроскопическую организацию бактерий, но у них отсутствует ригидная клеточная стенка. Клетки микоплазм снаружи покрыты трехслойной мембраной толщиной 7,5–10 нм; внутри содержатся цитоплазма и дифференцированный нуклеоид, представленный замкнутой в кольцо молекулой ДНК, формирующей одну хромосому. В цитоплазме находятся рибосомы, их размер соответствует величине рибосом бактерий. У микоплазм также обнаружены внутрицитоплазматические мембранные структуры, выполняющие функцию субстрата синтеза энергии, и отсутствуют типичные мезосомы.

Химический состав микоплазм сложный. Наиболее хорошо изучены липиды, входящие в состав липопротеинового комплекса трехслойной клеточной мембраны. Главный липидный компонент паразитических микоплазм — холестерин. Он обладает свойством стабилизировать мембраны и придавать им эластичность, а также обеспечивает структурную целостность клеток, способствует проникновению жирных кислот и их утилизации, оказывает детоксинное действие на жирные кислоты, лизирующие микоплазмы и, наконец, служит энергетическим материалом. Белки микоплазм менее изучены, они входят в состав цитоплазмы и мембран и состоят из 17 аминокислот. Гидрофобные компоненты мембранных белков микоплазм обладают выраженной антигенностью. Углеводный состав микоплазм варьирует в зависимости от вида.

Культивирование. Микоплазмы размножаются в бесклеточных питательных средах, содержащих полноценный белок, холестерин, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины и минеральные соли.

Для культивирования микоплазм предложен ряд сред, основа которых — триптический перевар бычьего сердца, перевар Хоттингера, пептон Мартена, отвар сердечной мышцы. К основной среде в зависимости от вида микоплазмы добавляют дрожжевой экстракт, нормальную сыворотку крови лошади или крупного рогатого скота, витамины, нуклеиновые кислоты, углеводы (чаще глюкозу).

Микоплазмы можно культивировать в мартеновском МПБ и на МПА с добавлением 15–20% сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 1% глюкозы; рН 7,4–8,0. Широко используют среду Эдварда, основу которой составляет отвар сердца крупного рогатого скота с добавлением 1% пептона, 20% сыворотки лошади и 10% дрожжевого экстракта, а также полужидкий и плотный агар Эдварда. Для получения полужидкого агара к бульону добавляют 0,3% агар-агара, а для плотного — 2%. Большое практическое применение получила среда следующего состава: основа — перевар Хоттингера, 0,3% поваренной соли, 0,5% пептона, 0,5% двузамещенного фосфорнокислого натрия, 0,5% глюкозы и 20% стерильной сыворотки лошади.

В жидких питательных средах первичные культуры микоплазм вызывают незначительную опалесценцию; адаптированные же к среде культуры дают заметное помутнение. Более обильный рост отмечают ближе к стенке или непосредственно на стенке стеклянного сосуда. Одни виды микоплазм дают придонный, другие — поверхностный рост, что обусловлено их потребностью в кислороде. Отдельные виды и штаммы могут образовывать на поверхности бульона едва заметную, легко разбивающуюся маслянистую пленку. В полужидких питательных средах микоплазмы растут по уколу или же формируют крошковатые колонии различной конфигурации, равномерно взвешенные в среде, а на плотных средах — характерные колонии, напоминающие по форме яичницу-глазунью. Это типичные колонии микоплазм, они вырастают в агар и имеют более темный центр; периферия колоний более светлая и менее гранулированная.

У них есть сходство с колониями L-форм бактерий типа А, но они характеризуются меньшими размерами и более зернистой поверхностью. Размер колоний, как правило, не превышает 0,25–2,0 мм. При продолжительном культивировании на сыровороточных средах многие виды микоплазм образуют в глубине среды пятна преципитата.

Рост в первичных культурах наблюдают через 3–7 сут, адаптированные к среде штаммы растут значительно быстрее. Для первичного выделения микоплазм можно использовать 5–7-суточные куриные эмбрионы, их заражают в желточный мешок. Гибель эмбрионов наступает с 3–5-го пассажа. Получены также положительные результаты при заражении микоплазмами клеточных культур.

Биохимические свойства. Микоплазмы обладают сложными ферментными системами. По характеру метаболизма микоплазмы подразделяют на три группы: ферментативно активные стеролозависимые, ферментативно активные стеролонезависимые и ферментативно неактивные. Первые (истинные микоплазмы) нуждаются для роста в холестерине и ферментируют с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, маннозу, фруктозу, крахмал и гликоген. Вторые (ахолеплазмы) также расщепляют с образованием кислоты указанные выше углеводы; некоторые штаммы разлагают сахарозу и галактозу. Третьи восстанавливают тетразолевые соединения, окисляют лактат и глутанат, но не ферментируют углеводы. Микоплазмы не восстанавливают нитриты и не образуют индола, некоторые штаммы выделяют сероводород и аммиак.

Отдельные виды микоплазм в сыровороточных средах редуцируют метиленовую синь, обладают пероксидазной активностью, имеют геагглютинин и продуцируют гемолизин, вызывая агемолиз-гемолиз.

Антигенная структура. У микоплазм антигенная структура очень сложна и имеет видовые, а также вариантыные различия, которые можно установить, используя реакции агглютинации, пассивной геагглютинации, связывания комплемента, иммунодиффузии в геле, реакцию ингибиции роста и др.

Функцию антигенов у микоплазм выполняют липидные, полисахаридные и белковые компоненты, избирательная активность которых зависит от вида и серовара микоплазм.

Патогенность. У некоторых видов микоплазм выделены экзотоксины. *M. gallisepticum* продуцирует экзотоксин нейротропного действия, который у индеек вызывает симптомы, указывающие на поражение центральной нервной системы. Небольшие дозы этого экзотоксина у птиц вызывают изменения в мозге и суставах. Экзотоксин также образует *M. Neurolyticum*. Эндотоксические субстанции продуцируют *M. Mycoides subsp. mycoides* и *M. Mycoides subsp. capri*, они известны под названием галактана и глюкоана.

Микоплазмы имеют важное значение в инфекционной патологии животных: они могут поражать отдельные органы, системы органов и вызывать специфические заболевания (см. табл. 7).

14.9.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ КОНТАГИОЗНОЙ ПЕРИПНЕВМОНИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Перипневмония (плевропневмония, повальное воспаление легких (ПВЛ)) — контагиозный микоплазмоз крупного рогатого скота, характеризуется экссудативным поражением легких с выраженным серозным воспалением междольчатых перегородок, серозно-фибринозным плевритом, скоплением в грудной полости большого количества экссудата и образованием инкапсулированных очагов в легких, где длительное время обитает возбудитель.

Возбудитель болезни — *M. Mycoides subsp. mycoides*.

Морфология. Микроорганизм имеет форму кокков, диплококков, колец, нитей, звезд, дисков или гроздевидных образований (рис. 38).

Нитевидные структуры достигают длины 125–240 мкм, отдельные овальные формы имеют размеры 0,2–0,8 мкм. Особенно полиморфизм выражен в бульонных культурах. Возбудитель проходит через бактериальные фильтры. В препаратах из культур микоплазма хорошо окрашивается по Романовскому — Гимзе, а также карболовым раствором анилиновых красителей.

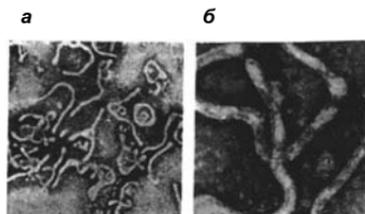


Рис. 38
Микоплазмы:

а — возбудитель перипневмонии крупного рогатого скота, $\times 12\ 000$; б — возбудитель инфекционной агалактии овец и коз, $\times 75\ 000$.

Культивирование. Для выделения культур чаще всего используют мартеповский бульон с 10–15% сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади, добавление 10% свежего дрожжевого экстракта стимулирует рост. Можно применять среду Эдварда. Элективной плотной средой служит мартеповский агар, который готовят путем добавления к бульону 1,5–3% агара. Посевы инкубируют при 37–38°C. В бульоне рост проявляется на 2–3-е сутки в виде опалесценции различной интенсивности или муаровых волн при встряхивании. На агаре возбудитель растет в виде характерных круглых, с ровными краями колоний, напоминающих яичницу-глазунью, центр колонии — в виде нежного сосочка или глазка, оптически более плотный, врастает в толщу среды. На кровяном агаре формирует зону α -гемолиза. Ферментирует глюкозу, мальтозу, маннозу, крахмал, образует сероводород.

Устойчивость. В окружающей среде устойчивость микроба незначительная. Высушивание и действие солнечных лучей на пастбище уничтожают микроб через 5–24 ч; в экссудате из грудной полости при 4–8°C он сохраняет вирулентность до 8 сут; нагревание до 58°C убивает его в течение 1 ч, в бульонных культурах при 37°C гибнет через 3 нед. В замороженных легких и лимфе возбудитель может сохраняться от нескольких месяцев до года, в лиофилизированных бульонных культурах и экссудате — более 5 лет.

Гидроксид натрия, хлорная и свежегашеная известь, формалин в обычных концентрациях обезвреживают возбудителя через 3–4 ч.

Патогенность. Возбудитель обладает выраженной патогенностью для крупного рогатого скота и близких ему видов: буйволов, бизонов, зебу, яков. Естественное заражение происходит через дыхательные пути при вдыхании капелек или пылинок с возбудителем, выделяемым больными со слизью из респираторных органов и с мочой.

Патогенез. Возбудитель, проявляя выраженный тропизм к легочной ткани, проникает в паренхиму легких и легочные лимфатические узлы, начинает интенсивно репродуцироваться и выделять экзо- и эндотоксины. Развиваются воспаление, застойные явления, эмболия кровеносных и лимфатических сосудов, образуются обширные очаги некроза легочных долей с последующим их секвестированием. В результате выключения из

газообмена больших участков легочной ткани и интоксикации нарушаются функции нервной, сердечно-сосудистой, выделительной систем, печени и других органов, что приводит к декомпенсированному расстройству гомеостаза и гибели животного.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая диагностика основана на выделении культуры микоплазм из плеврального экссудата на специальных сывороточных средах. С этой целью проводят 2–3 пассажа. При первичном возникновении болезни в благополучном хозяйстве рекомендуется ставить биологическую пробу на 2–3 здоровых 6–8-месячного возраста телятах. Им вводят подкожно в области подгрудка, интратрахеально или интраплеврально экссудат от больных животных или культуру и некоторое время ведут наблюдение (до 30 сут).

В серодиагностике используют РСК как метод прижизненного выявления больных и инкубатиков в стаде. В комплексе с другими методами исследования эта реакция имеет исключительное значение в диагностике.

В ряде стран готовят культуральные антигены. Однако необходимо помнить, что РСК с сывороткой крови животных — носителей *M. bovis genitalium* и других видов микоплазм — может давать ложноположительные результаты.

В качестве диагностического теста испытана реакция непрямой гемагглютинации, чувствительность которой с сыворотками, взятыми в острой фазе болезни, выше, чем РСК. Напротив, с сыворотками крови хронически больных она по чувствительности уступает РСК.

Положительные результаты получены также при испытании реакций иммунодиффузии в геле, ингибиции роста и иммунофлюоресценции. Предложена кожная аллергическая проба.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие перипневмонией животные приобретают длительный иммунитет, хотя его продолжительность точно не установлена. Напряженность поствакцинального иммунитета также высока и продолжается до двух лет.

Длительное время применяли живую вакцину, что позволило резко снизить процент поствакцинальных осложнений и получить более напряженный иммунитет.

В настоящее время в странах, где встречается болезнь, животных прививают живыми культуральными вакцинами из

специально селекционированных штаммов. Наиболее широкое распространение получила вакцина из восточноафриканского штамма Т1. Вакцину вводят в кончик хвоста в дозе 0,5 мл или подкожно в области шеи в дозе 1 мл. Она создает достаточно напряженный иммунитет (до года) и не вызывает поствакцинальных осложнений. У привитых животных в крови образуются комплементсвязывающие антитела.

14.9.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ ИНФЕКЦИОННОЙ АГАЛАКТИИ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

Инфекционная агалактия овец и коз — контагиозная болезнь, вызываемая *Mycoplasma agalactiae*, характеризующаяся прекращением секреции молока, поражением молочной железы, суставов и глаз. У беременных животных наступают аборт.

Возбудителя выделили в 1923 г. Ж. Бридре и А. Донатъен.

Морфология. *M. agalactiae* характеризуется выраженным полиморфизмом, проходит через бактериальные фильтры; размеры минимальных репродуцирующихся частиц в пределах 250–400 нм. В мазках из бульонных культур обнаруживают шаровидные, овальные, дисковидные, кольцевидные или мицеллярные (до 25 мкм) структуры. Микоплазмы окрашиваются хорошо по Романовскому — Гимзе, азурэозином, импрегнируются серебром по Морозову и не красятся по Граму.

Культивирование. Для выращивания возбудителя применяют специальные среды с сывороткой крови лошади или крупного рогатого скота. С этой целью используют среду Эдварда или среду, приготовленную на основе мартеновского бульона. В жидких питательных средах рост *M. agalactiae* сопровождается слабой опалесценцией, достигающей максимума на 3–5-е сутки выращивания. На твердых питательных средах образует характерные округлые колонии с мелкозернистой поверхностью и более темным, врастающим в агар центром. В полужидкой питательной среде появляется интенсивное нежное помутнение у поверхности среды и по ходу укола.

Биохимические свойства. Микоплазма не сбраживает глюкозу, не гидролизует аргинин, не образует индола и сероводорода. Обладает выраженной гемолитической активностью, особенно в отношении эритроцитов лошади, овец и кур. На плотной

среде в анаэробных условиях восстанавливает тетразолий. Продуцирует фосфатазу, не разжижает свернутую сыворотку крови.

Устойчивость. На кормах, предметах ухода и в стойлах микоплазма сохраняется 2–3 нед., в почве на пастбище — не более 25 сут, в навозе — до 10, в воде — 30, в молоке — до 10 сут. Исключительно устойчива к низким температурам. Дезинфектанты в обычных концентрациях (креолин, едкий натр, формалин) убивают микоплазму в течение четырех часов.

Патогенность. В естественных условиях болеет мелкий рогатый скот, овцы и козы всех пород и возрастов. Наиболее восприимчивы лактирующие животные, козлята и ягнята до месячного возраста. Молодняк старших возрастных групп, нелактирующие матки и самцы более резистентны. Лабораторные животные к возбудителю невосприимчивы, но он хорошо развивается в куриных эмбрионах, которые заражают в желточный мешок.

Патогенез. Из места проникновения микроб попадает в кровь и разносится в различные органы и ткани, обуславливая в них воспалительные процессы.

Лабораторная диагностика. Материалом для бактериологического исследования служат молоко, выделения из пораженного глаза, жидкость из суставов и отеков, кровь; от павших и вынужденно убитых животных — паренхиматозные органы, лимфатические узлы, спинно-мозговая жидкость, головной мозг.

Микроскопию используют преимущественно при исследовании культур. Препараты окрашивают по Романовскому — Гимзе. Выделить культуру можно лишь при условии доставки совершенно свежего материала, не обсемененного посторонней микрофлорой. В жидких питательных средах рост появляется через 5–6 сут, на плотных — через 10–12 сут в виде одиночных очень мелких колоний. Часто в первичных культурах отсутствует видимый рост, что обуславливает необходимость проводить не менее пяти последовательных пассажей. Бактериологический диагноз сложный и трудоемкий.

Биопробу при необходимости ставят на лактирующих козах и козлятах. Заражающий материал (молоко, жидкость из суставов, суспензию внутренних органов, обработанную пенициллином и ацетатом таллия, а также свежевыделенные культуры) вводят подкожно или в молочную цистерну в дозе 5–10 мл

материала. Инкубационный период при экспериментальном заражении составляет 2–14 сут. При заражении кроликов в переднюю камеру глаза в положительных случаях через 5–12 сут развивается кератит.

Методы серологической диагностики не нашли широкого применения в практике.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных иммунитет стойкий, нестерильный.

В ряде стран испытывали живые и убитые вакцины против инфекционной агалактии овец и коз; они создают иммунитет достаточной напряженности в течение одного года. Сыворотки крови реконвалесцентов и гипериммунизированных животных обладают незначительным предохранительным действием и практически не оказывают лечебного эффекта.

14.9.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ РЕСПИРАТОРНОГО МИКОПЛАЗМОЗА КУР И ИНДЕЕК

Респираторный микоплазмоз — инфекционная контагиозная болезнь кур и индеек, характеризующаяся поражением воздухоносных мешков и хроническим течением.

Возбудитель *Mycoplasma gallisepticum* открыт в 1936 г. Д. Нельсоном.

Морфология. *M. gallisepticum* представляет собой кокковидные клетки размером 500–800 нм. Зрелые клетки и минимальные репродуктивные частицы проходят через бактериальные фильтры. Вирулентные штаммы обладают относительной морфологической стабильностью, авирулентные же разновидности полиморфны. Как и все микоплазмы они грамотрицательные, по Романовскому — Гимзе окрашиваются в фиолетовый цвет.

Культивирование. Выращивают микроб в жидких и на плотных питательных средах Эдварда и УНИИЭВ. Среда УНИИЭВ на основе гидролизата мясного фарша содержит пептон (0,5–1,0%), автолизат пекарских дрожжей (1%), глюкозу (0,5%), 20% сыворотки лошади. Применимы также среды, для изготовления которых использованы пептон Мартена или перевар Хоттингера. В жидких питательных средах микроб вызывает легкое, слабое помутнение; на плотных — формирует бесцветные, прозрачные, росинчатые колонии размером 10–200 мкм, трудно или

почти не различимые невооруженным глазом; поверхность гладкая, иногда шероховатая. Возбудителя удается культивировать в куриных эмбрионах, гибель которых наступает на 3–5-е сутки после заражения.

Биохимические свойства. Большинство штаммов сбраживает с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу и после многократных пересевов — галактозу и декстрин; встречаются ферментативно инертные культуры. Образуют аммиак, редко сероводород, индол. Патогенные штаммы агглютинируют эритроциты птиц.

Антигенная структура. У птичьих микоплазм очень сложная: описано большое количество различных серологических вариантов. *M. gallisepticum* характеризуется выраженной антигенной активностью.

Устойчивость. В птичнике при 5–10°C возбудитель сохраняется до 28 сут, при 12–18°C — 23 сут. Прямые солнечные лучи и температура 45–50°C убивают его через 20–40 мин, низкие температуры консервируют микроб. В лиофилизированном состоянии возбудитель сохраняет жизнеспособность до 10 лет. Данный вид микоплазм высокочувствителен к раствору хлорной извести (2% активного хлора), горячему 1,5–2%-му раствору гидроксида натрия, 2%-му раствору формалина.

M. gallisepticum чувствительна к тилану, спиромицину, стрептомицину, канамицину, неомицину, линкомицину. Описаны мутанты микоплазм, резистентные к антибиотикам.

Патогенность. *M. gallisepticum* патогенна для куриных и индюшиных эмбрионов, цыплят, индюшат, кур, индеек, цесарок, фазанов, куропаток, перепелов и голубей. В яйцо микоплазмы проникают в период его формирования в яичнике и прохождения по яйцеводу. В основном передача инфекции вертикальная — через инкубационное яйцо, а также с инфицированным инвентарем, кормом, водой и аэрогенным путем.

Патогенез. Микроб проникает в клетки эпителия и ткани респираторных органов, обуславливая воспалительный процесс и дистрофические изменения. Затем с током крови разносится по всему организму. При деструктивных изменениях в парабронхиальных комплексах и кровеносных сосудах легких больных птиц нарушается газовый обмен и развиваются общие расстройства.

Лабораторная диагностика. Материалом для бактериологического исследования служат соскобы со слизистых оболочек гортани, трахеи, головной мозг, стенки воздухоносных мешков, кусочки легких от свежих трупов или убитых больных птиц. Исследуют также желточный мешок, легкие, трахею эмбрионов последних дней инкубации и 1–2-суточных цыплят. Возбудитель лучше сохраняется в замороженном материале.

Из патологического материала готовят суспензию на МПБ (1:10), которую для уничтожения посторонней микрофлоры обрабатывают пенициллином (5000–10 000 ЕД/мл) и уксуснокислым таллием. Смесь выдерживают при комнатной температуре 40 мин и высевают на среду Эдварда или другую специальную питательную среду.

Патогенность выделенной культуры микоплазмы определяют путем заражения куриных или индюшиных 9-суточных эмбрионов в аллантоисную полость. Биопроба считается положительной при условии гибели не менее 50% зараженных эмбрионов. Для этой же цели можно заражать куриные эмбрионы в желточный мешок. Биопробу также ставят на 1–2-месячных цыплятах или индюшатах; их заражают интраназально, интратрахеально и наблюдают в течение 2 мес.

Для прижизненной серологической диагностики применяют реакцию капельной агглютинации с цельной кровью (ККРА) или сывороткой крови (СКРА). Антиген готовят из культур трех различных серологических вариантов микоплазм, инактивированных формалином и мертиолатом.

Из серологических методов используют также реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), ингибиции роста, РСК, метод иммунофлюоресценции, а для анализа антигенного состава микоплазм — реакцию преципитации в агаровом геле.

Серологические методы для диагностики респираторного микоплазмоза птиц еще нуждаются в совершенствовании.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшая птица приобретает стойкий напряженный иммунитет, цыплята могут получать защитные антитела из желтка яиц кур-реконвалесцентов.

Для специфической профилактики предложен ряд инактивированных и живых вакцин.

14.10. ПАТОГЕННЫЕ РИККЕТСИИ

Риккетсии открыл в 1909 г. американский ученый Г. Риккетс при изучении пятнистой лихорадки Скалистых гор, а затем сыпного тифа. В 1913 г. С. Провачек также обнаружил риккетсии сыпного тифа в лейкоцитах человека. В честь погибших от сыпного тифа Г. Риккетса и С. Провачека бразильский ученый Э. Роха-Лима предложил именовать всю группу риккетсиями, а возбудителя сыпного тифа — риккетсией Провачека. В дальнейшем были выделены и изучены возбудители других риккетсиозов.

Классификация. Согласно определителю бактерий Берджи (1997) риккетсии внесены в отдел *Gracilicutes*, секцию 9 (риккетсии и хламидии), порядок *Rickettsiales*, содержащий три семейства: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* и *Anaplasmataceae*. Семейство *Rickettsiaceae* имеет 3 трибы, в которые включено 8 родов; *Rickettsia*, *Rochelima*, *Coxiella*, *Erlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* имеют наиболее важное значение для практики.

Патогенные риккетсии составляют значительно меньшую часть видов многочисленных представителей риккетсий.

Экология. В природе риккетсии циркулируют среди насекомых, грызунов, диких и сельскохозяйственных животных, от которых могут передаваться человеку. Распространение их среди людей и сельскохозяйственных животных происходит кровососущими членистоногими (вши, блохи, клещи), которые выделяют риккетсии с фекалиями (вши, блохи) или же с секретом слюнных желез (клещи).

У насекомых, членистоногих патогенные риккетсии могут вызывать смертельную инфекцию (сыпнотифозный риккетсиоз у вшей), а также бессимптомную пожизненную инфекцию (пятнистая лихорадка и цуцугамуши у клещей).

У грызунов риккетсиозы протекают, как правило, бессимптомно, но носительство возбудителя при этом может быть длительным (несколько месяцев).

У сельскохозяйственных и домашних животных (крупный и мелкий рогатый скот, собаки) риккетсиозы протекают в разных формах: бессимптомной инфекции (ку-лихорадка у крупного рогатого скота), тяжелой, часто с летальным исходом болезни (гидроперикардит).

У человека риккетсии вызывают лихорадку разнообразной тяжести (летальность от 0 до 90%), часто с характерными высыпаниями на коже и поражением мелких кровеносных сосудов.

Морфология и биологические свойства. Риккетсии — обширная группа плеоморфных бактерий, имеющих сходство в строении, содержании РНК и ДНК и ряде других свойств, грамматрицательные. Основное их отличие от других бактерий — внутриклеточный паразитизм. Различают четыре основных морфологических типа:

- кокковидные монозернистые риккетсии размером 0,3–1 мкм;
- палочковидные биполярные (гантелевидные, бизернистые) размером 1–1,5 мкм (выявляются при активном развитии риккетсиоза);
- бациллярные удлинённые, тетразернистые, обычно изогнутой формы размером 3–4 мкм (выделяются в начальном периоде болезни, слабовирулентные);
- нитевидные полизернистые риккетсии, размером 10–40 мкм (их выделение — показатель раннего, умеренного риккетсиоза).

Кокковидные риккетсии окрашиваются по Романовскому — Гимзе и Цилю — Нильсену в красный цвет, палочковидные и нитевидные — в красно-голубой (зерна-гранулы красные, цитоплазма между ними голубая); по Здродовскому — в красный цвет. Отмечены очень мелкие бактерии, проходящие через бактериальные фильтры и невидимые в обычном световом микроскопе. Формы риккетсии соответствуют, по-видимому, определенной фазе их развития. На ранней стадии внутриклеточной репродукции риккетсии неподвижны, спор и капсул не образуют, по структуре сходны с бактериями — имеют оболочку толщиной 7–8 нм, ядерное вещество расположено диффузно или представлено в виде гранул, в цитоплазме находится нуклеотид, имеющий спиралевидную или гранулярную структуру, обнаружены ДНК и РНК, рибосомы, дыхательная система аналогична прокариотам.

У риккетсиеподобных эрлихий (неориккетсий) своеобразный цикл развития. Патогенность свойственна так называемым элементарным тельцам (кокковидные образования, 0,4 мкм), в результате размножения которых образуются инициальные (ретикулярные) тельца (гомогенные образования неопределенной

формы, 1–2 мкм), затем морула, напоминающая тутовую ягоду (2–4 мкм), внутри которой формируются элементарные тельца.

Поскольку риккетсии не растут на искусственных питательных средах, то в условиях лаборатории их культивируют в обо-

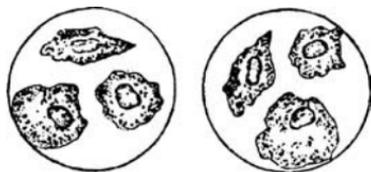


Рис. 39
Риккетсии

лочке желточного мешка куриных эмбрионов, в культуре тканевых клеток или в организме лабораторных животных. Размножаются они путем бинарного деления (рис. 39).

Устойчивость. Во внешней среде устойчивость риккетсий (за исключением риккетсий Бернета) невысокая. Нагревание во влажной среде до 50°C обеспечивает гибель большинства риккетсий через 5–30 мин, при 70°C — через 1–3 мин. Риккетсии Бернета (возбудитель ку-лихорадки) выдерживают длительное (30–90 мин) нагревание при 60–63°C и погибают только при кипячении. Низкие (минусовые) температуры не убивают, а лишь консервируют риккетсий.

Риккетсии Бернета в отличие от других видов могут сохранять жизнеспособность в высушенных фекалиях клещей до 48 мес., на шерсти — до 16, на песке, глине (при 15°C) — до 2 мес.; в кефире, молоке, твороге, мясе — до 30 сут, в соленом мясе — до 90 сут.

Дезинфицирующие вещества — 3–5%-е растворы фенола, 2%-й раствор хлорамина, 2%-й формальдегида, 10%-й раствор пероксида водорода и гидроксида натрия убивают риккетсий в течение 5 мин, а 1%-й раствор хлорной извести — через 10 мин.

Риккетсии чувствительны к тетрациклину, дибацину, синтомицину, левомецитину и некоторым другим антибиотикам.

Характеристика патогенных риккетсий отдельных родов

Риккетсии — облигатные внутриклеточные паразиты широкого круга животных. Характерен паразитизм у членистоногих. Представляют собой плеоморфные микроорганизмы кокковидной, палочковидной, бациллярной и нитевидной форм. Преобладают кокковидные (0,3×0,4 мкм) и палочковидные (до 2,5 мкм) формы. Грамотрицательные, неподвижные, не имеют жгутиков. Хорошо окрашиваются анилиновыми красками по Романовскому — Гимзе, Маккиавелло, Здродовскому, Гименесу.

Размножаются бинарным делением только в живых или перживающих тканях. Содержат РНК и ДНК, белки, углеводы, липиды, липополисахариды. Чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда.

Возбудители риккетсиозов животных и человека (ку-лихорадка, сыпной тиф и др.).

Эрлихии — мелкие плеоморфные микроорганизмы, размножающиеся в цитоплазме циркулирующих лейкоцитов восприимчивых хозяев.

Цикл развития: элементарное тельце → инициальное тельце (ретикулярное) → промежуточное тельце → элементарное тельце. Грамотрицательные, окрашиваются по Романовскому — Гимзе в синий цвет, неподвижные. В бесклеточных средах и куриных эмбрионах не размножаются. Чувствительны к тетрациклину.

Возбудители болезней крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, представителей семейства собачьих.

Ковдри — плеоморфные кокковидные или эллипсоидные микроорганизмы 0,2–0,5 мкм в поперечнике. Размножаются в цитоплазме эндотелия сосудов жвачных животных. Неподвижные, грамотрицательные. Красятся в синий цвет анилиновыми красками по Романовскому — Гимзе. Не растут в бесклеточных средах. Чувствительны к сульфаниламидам и тетрациклину. Переносятся иксодовыми клещами рода *Amblyomma*. Трансвариальная передача у клещей неизвестна. Вызывают сердечную водянку — септическую болезнь домашних животных в Африке. От вирулентных штаммов гибнет 20–96% животных.

Неориккетсии — мелкие плеоморфные организмы 0,3–0,4 мкм в поперечнике. Размножаются преимущественно в цитоплазме клеток лимфоидных тканей собак. Грамотрицательные, неподвижные. Красятся анилиновыми красками в синий цвет. Не растут на бесклеточных питательных средах. Чувствительны к тетрациклину. Переносчик — трематода.

Выделены у заболевших семейства собачьих на среднем и западном побережье США.

Бартонеллы — паразиты эритроцитов человека и других позвоночных. Округлые и эллипсоидные формы, или тонкие и прямые, или изогнутые палочки внутри эритроцитов либо на

их поверхности размером менее 3 мкм в диаметре. Окрашиваются анилиновыми красками, лучше всего по Гимзе после фиксации метиловым спиртом. В них не обнаружены эукариотические ядра, что отличает их от простейших, паразитирующих в эритроцитах. Грамотрицательны. Культивируют на средах без живых клеток. Представители рода *Bartonella*:

- имеют клеточную оболочку;
- размножаются бинарным делением;
- в культурах образуют жгутики на одном полюсе;
- вызывают бартонеллез человека;
- обнаружены у москитов;
- болезнь известна на южноамериканском континенте.

Род *Grachamella* обнаружен только в эритроцитах млекопитающих. Его представители:

- имеют клеточную стенку;
- неподвижны;
- жгутиков нет;
- грамотрицательные;
- вызывают грахамеллез грызунов;
- имеют широкое географическое распространение.

Анаплазмы — облигатные паразиты эритроцитов диких и домашних позвоночных. Палочковидные, сферические, кокковидные или кольцеобразные тельца 0,2–0,4 мкм в диаметре. Грамотрицательны. По Гимзе окрашиваются в красный цвет.

Риккетсиозы целесообразно подразделять на группы болезней в соответствии с родовой и видовой принадлежностью их возбудителей. Собственно риккетсии относят к возбудителям риккетсиозов (ку-риккетсиоз, сыпной риккетсиозный тиф и др.), эрлихии — эрлихиозов, коудрии — коудриозов, неориккетсии — неориккетсиозов, анаплазмы — анаплазмозов, бартонеллы — бартонеллезов и т. д.

14.10.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ КУ-РИККЕТСИОЗА (КУ-ЛИХОРАДКИ)

Ку-риккетсиоз (от *англ.* *queer* — неясный, неопределенный) вызывают *Coxiella burneti*, характеризуется развитием ринита, пневмонии, конъюнктивитами и абортами. Болеет крупный и мелкий рогатый скот. Другие виды животных, в том числе птицы, могут быть риккетсионосителями.

Морфология и тинкториальные свойства. Риккетсии Бернета — плеоморфные микроорганизмы, преобладают кокковидные и палочковидные формы шириной 0,2–0,4 мкм и длиной 0,4–1,0 мкм. Выявлены две фазы их существования, аналогичные гладким и шероховатым формам бактерий:

I — естественная форма существования микроорганизма;

II — форма существования при пассировании на куриных эмбрионах.

Эти фазы различаются по морфологии, патогенным, антигенным и другим свойствам. Обе фазы грамотрицательные, но при некоторых условиях окрашиваются по Граму положительно. Неподвижные, не имеют жгутиков.

Культивирование. Хорошо культивируются риккетсии в желточных мешках куриных эмбрионов, клеточных культурах (фибриобласты, L-клетки и др.), органах и тканях лабораторных животных (морские свинки, хомяки, белые мыши, кролики). Размножаются бинарным делением.

Устойчивость. В высохшей крови, взятой от больных животных, сохраняются 180 сут, в сухих фекалиях клещей — 586, в молоке при 4°C — от 40 до 150 сут, в моче и навозе — несколько недель.

Патогенность. Восприимчивы 70 видов млекопитающих, 50 видов птиц и более 40 видов кровососущих членистоногих (клещи, вши, блохи). Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствителен крупный и мелкий рогатый скот, у которого риккетсии могут вызывать остро и хронически протекающую болезнь. Экспериментально ку-риккетсиоз удавалось вызывать у обезьян, лошадей, коров, овец, домашних и диких птиц, сусликов, кроликов, хомяков, крыс, морских свинок и белых мышей.

Патогенез при ку-риккетсиозе наиболее полно изучен на экспериментальных животных. Установлено, что возбудитель, попав в организм хозяина аэрогенным, алиментарным, контактным путем или при укусе кровососущих насекомых, размножается в тканях и клетках ретикулоэндотелиальной системы, вызывая генерализованную инфекцию, и затем локализуется в основном в органах генитальной системы. Такая органотропность приводит к абортам и выделению риккетсий с околоплодной жидкостью, плацентой, молоком.

Антигенная структура. Возбудитель ку-лихорадки в природе у инфицированных людей и животных циркулирует в виде I фазы. Установлено наличие двух антигенов: поверхностного и соматического. Поверхностный антиген полисахаридной природы является ответственным за патогенность возбудителя. Оба антигена иммунологически активны и вызывают образование антител у экспериментально и естественно зараженных животных.

В 1984 г. Р. Г. Госманов и другие сотрудники Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (ВНИВИ) предложили диагностический набор, состоящий из антигена и иммунной сыворотки.

При многократном пассировании возбудителя I фазы в желточном мешке 6–7-дневных куриных эмбрионов поверхностный антиген утрачивается. Возбудитель переходит во II фазу и имеет только соматический антиген. В медицинской практике из такого штамма готовят вакцину (М-44) для иммунизации людей и антиген для обнаружения в сыворотке крови комплемент-связывающих антител. Диагностический титр антител к возбудителю I фазы в сыворотке крови обнаруживают на 40–60-е, а к возбудителю II — на 7–10-е сутки. В 1992 г. сотрудники ВНИВИ предложили комплексный антиген для обнаружения антител к возбудителю I и II фаз.

Лабораторная диагностика включает:

- выявление специфических антител в сыворотке крови животных с подозрением на ку-лихорадку в реакции длительного связывания комплемента (РДСК), диагностическим титром антител служит положительная РДСК в разведении исследуемой сыворотки крови 1:10 и выше;
- проводят РА и РИФ;
- обнаружение возбудителя в патологическом материале путем постановки биологической пробы.

Для лабораторного исследования используют материал, взятый прижизненно, — кровь, клещей, собранных с животных, выделения из матки и влагалища, плаценту абортировавшего животного, а от погибших и убитых с диагностической целью животных — кусочки пораженного легкого, головного мозга, селезенки, регионарные лимфатические узлы.

Для выделения возбудителя из исследуемого материала готовят суспензию в физиологическом растворе (1:10), в которую

добавляют пенициллин (1000 ЕД/мл) и стрептомицин (500 ЕД/мл). Затем через 2–3 ч проверяют ее на стерильность путем посева на сахарный МПА и в МПБ, среду Сабуро и используют для биопробы. Биопробу ставят на морских свинках массой 300–400 г, или на белых мышах массой 8–10 г, или на 6–7-суточных куриных эмбрионах. Приготовленный материал вводят внутрибрюшинно: морским свинкам в дозе 2 мл, белым мышам — 0,5–1,0, куриным эмбрионам в желточный мешок — 0,3–0,5 мл. Продолжительность инкубационного периода составляет от 3–5 сут до 2–4 нед.

Болезнь у морских свинок характеризуется повышением температуры тела (40,5°C и выше), угнетением общего состояния и потерей аппетита. На 2–3-е сутки после повышения температуры проводят диагностический убой. У вскрытых животных наблюдают признаки пневмонии, дегенеративные изменения печени, на селезенке фибринозный налет. Из паренхиматозных органов готовят мазки — отпечатки для микроскопии.

Мышей, павших через 4 сут и более и оставшихся в живых по истечении 12 сут, убивают под эфирным наркозом и вскрывают с соблюдением асептики. У вскрытых животных обнаруживают признаки пневмонии, увеличение селезенки и печени. Для микроскопии готовят мазки — отпечатки из селезенки.

Куриные эмбрионы, погибшие через 4 сут и более и оставшиеся в живых через 12 сут, вскрывают, извлекают желточные мешки и из них готовят мазки-отпечатки для микроскопии.

Разработаны различные методы окрашивания мазков-отпечатков для обнаружения возбудителя ку-лихорадки. Наиболее результативно окрашивание следующим методом. Высушенные на воздухе мазки фиксируют общепринятым способом и наносят основной фуксин Циля, разведенный бидистиллированной водой из расчета 15–18 капель фуксина на 10 мл воды. Мазки окрашивают в течение 5 мин, фуксин смывают водой, препарат погружают на 2–3 с в 0,5% -й раствор лимонной кислоты и промывают водой. Затем в течение 15–30 с окрашивают 0,5% -м водным раствором метиленовой сини и снова смывают водой; высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Риккетсии имеют вид палочек или кокков красного цвета на синем фоне.

Иммунитет. Изучен недостаточно. У зараженных животных (коровы, овцы и др.) отмечено длительное (свыше 2 лет) носительство возбудителя. В этот период возможна ре- и суперинфекция.

У людей, переболевших ку-лихорадкой, развивается относительно стойкий иммунитет.

Биопрепараты. Средства специфической профилактики животных отсутствуют. Больных животных лечат антибиотиками тетрациклинового ряда. В медицинской практике используют вакцину из штамма М-44 возбудителя II фазы ку-лихорадки.

14.10.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭРЛИХИОЗА СОБАК

Эрлихиоз — трансмиссивная лихорадочная болезнь, характеризующаяся истощением, панцитопенией, геморрагиями на слизистой оболочке и коже, длительным переживанием возбудителя в крови. Клиническое течение болезни условно разделено на лихорадочную, субклиническую и две терминальные фазы.

Вызывает *Ehrlichia canis* (*Rickettsia canis*) — облигатный внутриклеточный паразит моноцитов, лимфоцитов, тромбоцитов и нейтрофилов.

Морфология и тинкториальные свойства. Цикл развития *E. canis*: элементарное тельце → инициальное (ретикулярное) тельце → морула → элементарное тельце. Элементарное тельце — это кокковидное или овальное образование около 0,4 мкм в поперечнике, окруженное двойной мембраной, обладает инфекционностью и поражает здоровую клетку. В клетке происходит размножение элементарных телец, которые преобразуются в инициальное тельце — гомогенное образование неопределенной формы, имеющее в поперечнике 1–2 мкм. Постепенно в процессе внутренней перестройки инициальное тельце становится похожим на ягоду шелковицы, это типичное для цикла развития *E. canis* образование, размеры его могут достигать 2–4 мкм. Морула отделена от цитоплазмы одной оболочкой. Внутри морулы просматриваются элементарные тельца, на которые она распадается. Все формы *E. canis* окрашиваются по Гимзе в голубой, по Романовскому — в розовый цвет.

Культивирование. *E. canis* выращивают в культуре моноцитов собак в среде Игла с добавлением 20% сыворотки крови собаки при 37°C.

Биохимические свойства и устойчивость не изучены.

Патогенность. Менее вирулентны штаммы из Арканзаса, поражающие нейтрофилы; более вирулентны штаммы из Оклахомы, поражающие моноциты и лимфу; высоковирулентны штаммы, выделенные в Юго-Восточной Азии. Патогенность *E. canis* варьирует в зависимости от штаммовой принадлежности возбудителя. Наиболее чувствительны к эрлихиозу немецкая овчарка и гончая. Экспериментальная инфекция воспроизводится на собаках, у которых возбудитель обнаруживают в крови на 12–14-е сутки после заражения. К *E. canis* восприимчивы также макаки-резусы, лисицы, койоты. Лабораторные животные (мыши, крысы, хомяки, морские свинки) и куриные эмбрионы невосприимчивы.

Патогенез. *E. canis* размножается в циркулирующих лейкоцитах, приводя к резкой лейко-, тромбо-, панцитопении. У погибших животных находят геморрагии в подкожной клетчатке и большинстве внутренних органов, из которых более всего поражаются сердце, легкие, желудок, кишечный тракт и урогенитальные пути. Летальность при массовых заболеваниях достигает 18,5–19,4%.

Иммунитет. Нестерильный; возбудителя обнаруживают в крови более года. Перекрестный иммунитет с возбудителем неориккетсиоза собак не отмечен. Антитела к *E. canis* класса IgM и IgA у собак выявляют на седьмой день, и на 21 день — глобулины класса IgG.

Диагностика. Простой и надежный способ диагностики — выявление морул возбудителя в лейкоцитах собак (световая микроскопия мазков, окрашенных по Романовскому — Гимзе, и иммунофлюоресценция). Морулы обнаруживают, начиная с третьей недели болезни, в течение 2–5 лет. В качестве дополнительных тестов служат лейкопения, тромбоцитопения, γ -глобулинемия.

Биопрепараты. Специфическое лечение и меры профилактики не разработаны. Лечение тетрациклином из расчета 30 мг препарата на 0,45 кг массы собаки в течение 14 сут при оральном введении успешно только в острой лихорадочной фазе болезни.

14.10.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭРЛИХИОЗА ЖВАЧНЫХ И ВСЕЯДНЫХ

Эрлихиоз крупного и мелкого рогатого скота — трансмиссивная лихорадочная болезнь. У овец сопровождается потерей в массе. Описаны рецидивы через 3–4 нед. и летальные исходы в результате специфической пневмонии, аборт, бесплодие у баранов. У коров также наблюдаются лихорадка, потеря аппетита, вялость, снижение удоев.

Эрлихиоз жвачных и всеядных вызывают *Ehrlichia phagocytophila* (син. *E. ovis*, *E. bovis*), это плеоморфный риккетсиоподобный микроорганизм, размножается в лейкоцитах больных животных.

По морфологическим, тинкториальным свойствам, циклу развития близок к возбудителю эрлихиоза собак. Сохраняется 10 сут при 4–8°C, 18 мес. — при минус 70°C, 10 сут — в цитратной крови при комнатной температуре.

Переносчики возбудителя — иксодовые клещи.

Для лечения применяют антибиотики тетрациклинового ряда и сульфаниламидные препараты. Случаи заболевания людей не описаны.

14.10.4. ВОЗБУДИТЕЛЬ ГИДРОПЕРИКАРДИТА (КОУДРИОЗА)

Гидроперикардит вызывает *Cowdria ruminantium* (*R. ruminantium*). Болезнь жвачных и всеядных впервые описал Коудри в 20-е гг. XIX в. Протекает в септической форме с образованием серозного экстракта в грудной и брюшной полостях и сердечной сорочке. Характеризуется геморрагическим диатезом, лихорадкой. Наиболее опасна молниеносная форма, в результате которой без предшествующих клинических признаков наступает смерть животного. Характерно субклиническое течение, составляющее до 60–90 сут у коров, овец, коз и диких жвачных.

Возбудитель отличается по форме от риккетсий. Это кокковидные, эллипсоидные или палочковидные формы размером 0,2–0,5 мкм в диаметре. Размножаются в эндотелиальных клетках сосудов животных. Грамотрицательны. Красятся в темно-голубой цвет по Гимзе и другими основными анилиновыми красками. Патогенность составляет 20–95%. Обычные методы

культивирования неприменимы. Чувствительны к сульфаниламидам и тетрациклину.

Диагноз ставят на основании микроскопии мазков из соскоба эндотелия крупных сосудов (полая и яремная вены) и патолого-анатомических изменений органов.

14.10.5. ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕОРИККЕТСИОЗА СОБАК

Неориккетсиоз — остролихорадочная болезнь собак и других животных сем. *Canidae* с генерализованным поражением лимфатической системы, сопровождающаяся резким обезвоживанием, рвотой, депрессией, полным отсутствием аппетита, иногда сыпью в области живота, абортами. Летальность достигает 90%.

Неориккетсиоз (эрлихиоз) собак вызывает *Neorickettsia helminthoeca*. Возбудителя описал С. Филип в 1953 г. как новый вид и род в трибе *Ehrlichieae*.

Морфология и тинкториальные свойства. Неориккетсии — мелкие кокковидные, чаще плеоморфные организмы, располагающиеся в цитоплазме клеток. Поражают главным образом ретикулоэндотелиальные клетки лимфоидных тканей представителей семейства *Canidae* и никогда не поражают циркулирующих лейкоцитов, что характерно для видов рода *Ehrlichia*. При изучении тонкого строения *N. helminthoeca* установлено, что у нее имеется аморфное центральное тело, окруженное трехслойной мембраной. Риккетсии лежат в вакуоли, стенка которой образована клеткой хозяина.

Грамотрицательные, красятся по Гимзе в голубой, по Маккиавелло — в голубой и розовый цвета. Неподвижны. Не растут на питательных средах. Попытки культивирования на куриных эмбрионах безуспешны.

Экспериментальную инфекцию воспроизводят на собаках.

Возбудитель длительно (до 158 сут) сохраняется при -20°C и при лиофилизации в стерильном молоке.

Болеют представители семейства *Canidae* — собаки, койоты, лисицы при поедании свежей рыбы, инвазированной нематодами, содержащими возбудителя.

Установлена зараженность неориккетсиями всех стадий трематоды.

В поддержании инфекции в природном очаге, возможно, бóльшую роль, чем собаки, играют другие виды, служащие definitivoными хозяевами. Они не болеют риккетсиозом собак, но способствуют его распространению, выделяя риккетсии вместе с трематодами и фекалиями в окружающую среду.

Лабораторная диагностика. Используют методы световой микроскопии мазков из лимфатических органов больного животного и иммунофлуоресценции.

Антигенные свойства. Не изучены; попытка приготовить антиген для реакции связывания комплемента безуспешна.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет продолжительный, в эксперименте собаки устойчивы к повторному заражению. Не установлено перекрестных реакций между неориккетсиями и эрлихиями.

Специфические средства лечения и профилактики не разработаны. *N. helminthoeca* чувствительны ко многим антибиотикам, а также к сульфаниламидным препаратам. Лечение эффективно в начале лихорадочного периода при использовании антибиотиков тетрациклинового ряда.

14.11. ПАТОГЕННЫЕ ХЛАМИДИИ

Начало исследований хламидиозов, и в первую очередь пситтакоза (орнитоза), относят к 1892–1895 гг., когда была установлена роль попугаев в заражении людей. В 1929–1930 гг. Левинталь выявил мелкие сферические образования в тканях больных птиц. В 1942 г. Мейер выделил и изучил возбудителя пситтакоза (орнитоза) птиц. К настоящему времени определена этиологическая роль хламидий в возникновении многих спонтанных инфекций сельскохозяйственных и диких животных разных видов, в том числе птиц, а также человека.

Классификация. Хламидии принадлежат к семейству *Chlamydiaceae* и роду *Chlamydia*, который включает более 30 возбудителей. На основании морфологических и биохимических отличий хламидии разделены на два вида: *Chlamydia trachomatis* (подгруппа А — возбудитель трахомы человека) и *Chlamydia psittaci* (подгруппа В). В ветеринарной практике наибольшее значение имеет *Chlamydia psittaci* — возбудитель

орнитоза (пситаккоза), различные штаммы которого вызывают хламидиоз с неодинаковыми клиническими признаками. Возбудитель хламидийного аборта не имеет специфического наименования, принадлежит к роду *Chlamydia*.

Аборт у крупного рогатого скота, овец и животных других видов вызывают разные штаммы. Патогенные хламидии — пневмонии, аборт, энтериты, менингоэнцефалиты, полиартриты, конъюнктивиты, то есть разнообразны по патогенезу и симптомам болезни. Один и тот же возбудитель вызывает как латентные, так и острые инфекции.

Срок персистенции хламидий в организме животных весьма продолжителен.

Возбудители хламидийного аборта, особенно орнитоза, представляют большую опасность для человека.

Морфология и биологические свойства. Морфология хламидий своеобразна. Инфекционные формы — это округлые элементарные тельца величиной 200–400 нм. Они неподвижные, грамтрицательные. При окрашивании по Маккиавелло приобретают преимущественно красный цвет, по Романовскому — Гимзе — красно-фиолетовый в зависимости от стадии их развития. Под обычным световым микроскопом имеют вид точечных образований. Элементарные тельца имеют двухслойную оболочку, электронно-плотную цитоплазму (нуклеоид) в центре, окруженную более светлым периферическим слоем, в состав которого входят ДНК и РНК.

Культивирование. Хламидии культивируют чаще в куриных эмбрионах (путем заражения в желточный мешок) или в клеточных культурах: диплоидные клетки, куриные фибробласты, амнион человека, суспензия L-клеток (возбудитель орнитоза), почка эмбриона коровы (возбудитель хламидийного аборта крупного рогатого скота), тестикулы ягнят, Нер-2 (возбудитель аборта овец).

Цикл развития хламидий имеет много общего с размножением неориккетсий (эрлихий). Элементарные тельца концентрируются в цитоплазматических вакуолях. В них же они превращаются в крупные ретикулярные (сетчатые) формы до 800–1000 нм в диаметре. Эти формы неинфекционны, размножаются путем бинарного деления, превращаясь в мелкие уплотненные тельца. В одном цитоплазматическом включении могут находиться

хламидии на разных стадиях развития — крупные и мелкие и, наконец, очень крупные округлые образования (1–12 мкм), называемые микроколониями, которые распадаются, высвобождая сотни элементарных телец. Однако несмотря на большое сходство в биологии у хламидий и риккетсий есть и существенные различия. Хламидии развиваются более интенсивно в клетке с высоким уровнем метаболизма, у них не выявлены собственный энергетический метаболизм и система переноса электронов. Кроме того, у хламидии инфекционностью обладают только элементарные тельца, а у риккетсий инфекционны все формы развития.

Устойчивость. Повышенная температура способствует быстрой инаktivации хламидий: при нагревании до 56°C — через 5 мин, до 100°C — в течение 1 мин; УФИ убивает хламидии в течение 3–4 мин. Оптимальный pH среды 7–7,4. При воздействии различных дезинфицирующих веществ — 0,1%-го раствора формальдегида, 0,5%-го раствора фенола, 2%-го раствора хлорамина и щелочи, спирта, эфира, йода, перманганата калия, кислот — хламидии погибают в течение 1–30 мин. Длительно сохраняют жизнеспособность при –70°C. Белковые вещества, добавленные к суспензии хламидий, повышают их устойчивость к физико-химическим факторам. Лиофильное высушивание инфицированных желточных мешков с добавлением 5% сахарозы — наилучший способ длительного хранения хламидий (до 3 лет).

Хламидии чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда. При обработке патологического материала, содержащего хламидии, применяют стрептомицин (500 мкг/мл и выше), ристоцедин (1000 мкг/мл), ванкомицин (100 мкг/мл среды), канамицин, которые губительно действуют на бактерии, но не влияют на хламидии.

Патогенность. В естественных условиях возбудители хламидиозов проявляют патогенность в отношении диких и домашних птиц различных видов (свыше 130) и в меньшей мере — млекопитающих. Из домашних птиц чаще болеют утки, индейки, гуси, реже — куры, голуби. Молодняк более чувствителен, чем взрослая птица. Взрослая птица в большинстве случаев выздоравливает, но остается хламидионосителем. Восприимчив к хламидиям и человек. Из лабораторных животных к заражению

хламидиями восприимчивы белые мыши, морские свинки, цыплята (используют для определения вирулентности штаммов, выделенных от больных птиц) и в меньшей степени — кролики, белые крысы и хомяки. Для биопробы при диагностике орнитоза в основном используют мышей и цыплят, при диагностике хламидийного аборта — морских свинок. Следует иметь в виду, что у мышей, морских свинок и цыплят возможен спонтанный хламидиоз, протекающий как латентная инфекция.

Антигенная структура. Элементарные тельца хламидий содержат групповой термостабильный комплементсвязывающий антиген (участвует в РСК), общий для возбудителей орнитоза, аборта крупного рогатого скота и овец, энзоотической пневмонии свиней и хламидий других видов (этот антиген не разрушается при кипячении, автоклавировании), и видоспецифический термолабильный антиген, который инактивируется при нагревании до 60°C, реагирует с сыворотками, специфическими в отношении отдельных видов хламидий. Первый из этих антигенов может быть выявлен в РСК, РА, реакции преципитации в геле, РИФ; второй — в РН, РСК, РП. Кроме того, в элементарных тельцах обнаружен гемагглютинин, по-видимому, имеющий связь с группоспецифическим антигеном и выявляемый в РГА, РЗГА и РНГА.

Возбудители основных хламидиозов. *Chlamydia psittaci* вызывает патологию у многих видов животных, включая диких и синантропных птиц. Болеет также человек. Наиболее значимы орнитоз и хламидийные аборты сельскохозяйственных животных (крупного и мелкого рогатого скота, свиней, лошадей).

14.11.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ ОРНИТОЗА

Орнитоз (пситтакоз) — острая лихорадочная болезнь птиц и человека. Протекает латентно и остро как кишечная инфекция (птицы) или с признаками пневмонии (телята, свиньи). У человека отмечается легочная форма орнитоза. Возбудителя впервые выделил К. Мейер в 1933 г.

Морфология и тинкториальные свойства. Хламидии подгруппы В. Элементарные тельца имеют округлую форму размером 250–350 мкм. Располагаются в цитоплазме макрофагов и клетках ретикулоэндотелиальной системы (иногда внеклеточ-

но) в виде крупных скоплений, цепочками или парами. Окрашиваются по Романовскому — Гимзе в сине-фиолетовый или красновато-фиолетовый цвет. При окраске по Здродовскому или Маккиавелло приобретают красный цвет, а по Кастанедо — голубой.

Культивирование. *Ch. psittaci* культивируют чаще в желточном мешке куриных эмбрионов, в культуре растущих и переливаемых клеток: HeLa, Нер-2, СОЦ, а также на белых мышцах путем их заражения интраназальным, внутримозговым и внутривентрикулярным методами.

Устойчивость. На скорлупе яиц в инкубаторе возбудитель выживает 3 сут, в помете птиц — до 3–4 мес. При нагревании до 70°C погибает в течение 10–15 мин. В замороженном состоянии (–70°C) сохраняет жизнеспособность до 2–3 лет.

Формальдегид (1:500), 5% -й раствор фенола, 1% -й раствор соляной кислоты и 2% -й раствор хлорамина при комнатной температуре инактивируют в течение 3 ч.

Патогенность. К *Ch. psittaci* наиболее чувствительны дикие птицы, у которых болезнь протекает с высокой летальностью (30–50%). Особенно тяжело болеют дикие и домашние птицы в возрасте до 6–8 мес. Заражаются и болеют орнитозом птицы 132 видов, 28 семейств, 15 отрядов. Основные симптомы болезни — диарея, насморк, конъюнктивиты. Грызуны и эктопаразиты могут быть носителями возбудителя.

У лабораторных животных (белые мыши) обычно развивается пневмония. При заражении высоковирулентными штаммами мыши гибнут на 3–7-е сутки, часть из них может выживать, но в легких у них находят очаги воспаления (уплотнение тканей).

У человека восприимчивость к возбудителю орнитоза очень велика. Болеют люди всех возрастов; пожилые переносят болезнь тяжелее. Заболеваемость людей может достигать более 30%.

Патогенез. Орнитоз возникает после проникновения возбудителя через слизистые оболочки верхних дыхательных путей или пищеварительного тракта. При аэрогенном заражении (основной путь) первичное развитие хламидий происходит в легких и регионарных лимфатических узлах. При этом нарушаются целостность альвеолярного эпителия, структура ткани, повреждаются кровеносные сосуды, а возбудитель проникает в кровь, паренхиматозные органы, кишечник. Хламидиemia обычно сопровождается токсемией. Токсины (некротоксин)

повреждают сосудистую систему и способствуют появлению некрозов в различных органах и тканях. У птиц воспалительный процесс развивается преимущественно в кишечнике, незначительно — в легких. У млекопитающих в основном поражаются легкие (бронхопневмония). Трансовариальная передача возбудителя не доказана.

Антигенная структура. Возбудитель орнитоза содержит два типа комплементфиксирующих антигенов: термостабильный и термолабильный. Первый состоит из полисахаридов, выдерживает нагревание до 135°C, второй содержит белки, разрушается при температуре 60°C.

Лабораторная диагностика. Для установления диагноза на орнитоз применяют серологический и аллергический методы, световую и флюоресцирующую микроскопию, биопробу.

Для выделения хламидий берут от птиц обычно кишечник, а от млекопитающих — пораженные участки (некроз и другие изменения) легких, паренхиматозных органов и кишечник.

Приготовленные для микроскопии мазки окрашивают по методу Маккиавелло (элементарные тельца — красного цвета) или Романовскому — Гимзе (хламидии в зависимости от стадии развития приобретают красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет). Применяют также люминесцентную микроскопию: метод флюорохромирования позволяет выявить молодые формы, содержащие преимущественно РНК (они кирпично-красного цвета), и более зрелые, ДНК которых светится зеленым цветом. Кроме того, используют реакцию иммунофлюоресценции — РИФ (непрямой вариант с применением антикомплементарной флюоресцирующей сыворотки).

Наиболее надежный метод выделения возбудителя — заражение 6–7-суточных куриных эмбрионов в желточный мешок. Для этого из патологического материала готовят суспензию в физиологическом растворе (1:10), обрабатывают ее стрептомицином (500 ЕД/мл среды) или другим антибиотиком, к которому нечувствительны хламидии. При комнатной температуре проверяют на стерильность путем посева в МПБ и на МПА с глюкозой и вводят 0,2–0,25 мл суспензии шприцем или пастеровской пипеткой в желточный мешок 4–6-суточных куриных эмбрионов, которые затем инкубируют в термостате при 37°C. Так проводят 3–4 «слепых» пассажа. После последнего пасса-

жа хламидии обнаруживают микроскопически в препаратах мазках из растертых оболочек желточного мешка. В случае отсутствия хламидий результат считают отрицательным.

Культуры клеток для выделения хламидий из патологического материала используют реже. Цитопатогенное действие хламидий микроскопически малозаметно, хотя они размножаются в клетках; через 24–96 ч происходит их накопление, вакуолизация и деформация ядра клетки, образование включений (микрочлонины), оболочка которых вскоре разрывается (чаще после гибели клетки), элементарные тельца освобождаются и попадают в межклеточное пространство. Для выявления элементарных телец клеточный монослой, полученный на стеклянных пластинках, окрашивают по Маккиавелло, Романовскому — Гимзе или применяют РИФ.

Для биопробы используют 6–10-суточных цыплят, реже — 2–2,5-месячных. Результат зависит от вирулентности возбудителя: в положительном случае возникает заболевание, протекающее в острой (с признаками поражения кишечника) или латентной форме. Материалом, полученным от птиц и млекопитающих, заражают белых мышей интраназально, интрацеребрально или в брюшную полость (по 0,2–0,5 мл): в первом случае у мышей возникает пневмония, во втором — менингоэнцефалит, в третьем — перитонит и пневмония.

Для серодиагностики используют РСК (диагностически достоверен титр антител 1:8, 1:16), реакцию подавления (связывания) комплемента (РПК); группоспецифический антиген определяют с помощью РГА, используя эритроциты кур или мышей.

В целях ранней диагностики орнитоза у кур применяют РИФ, в которой исследуют препараты-отпечатки со слизистой оболочки клоаки (начиная с восьмого дня после заражения) и других органов убитых кур.

Для аллергической диагностики (кожная проба) применяют орнитин, представляющий собой экстракт возбудителя. Птицам его вводят в бородку или кожную перепонку лапки; через 6–8 ч отмечают покраснение на месте введения аллергена, образование инфильтрата, который рассасывается через 18–24 ч. Положительная аллергическая реакция проявляется через 2–5 сут болезни или в течение 2 мес. и более.

Иммунитет. После переболевания орнитозом возникает непродолжительный иммунитет, возможны рецидивы болезни. Известно, что состояние невосприимчивости к инфекции обеспечивают в основном антитела разных типов, синтезируемые иммунокомпетентными клетками в первые дни болезни. Комплементсвязывающие антитела в разных титрах (1:3–1:64) сохраняются в крови 1–2 мес.

Биопрепараты. Специфические препараты для лечения и профилактики орнитоза птиц не разработаны. Лечение проводят антибиотиками тетрациклинового ряда, лучше пролонгированного действия (дитетрацилин и др.). У людей для лечения применяют тканевую инактивированную вакцину, предложенную И. И. Терских и А. Ю. Беклешовой (1963).

14.11.2. ВОЗБУДИТЕЛИ ХЛАМИДИОЗОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Хламидийный аборт (синонимы: энзоотический аборт, «вирусный аборт» и др.) — болезнь, протекающая чаще хронически с поражением околоплодных оболочек, что приводит к абортам, преждевременному рождению мертвых или нежизнеспособных телят, ягнят, поросят, жеребят; иногда (при проникновении хламидий в кровь) возникают пневмония, энтериты и полиартриты (последние патологические состояния отмечаются и у людей); у телят до 6-месячного возраста болезнь характеризуется поражением респираторных путей, пневмонией, диареей, иногда нарушением функций центральной нервной системы.

Хламидии, вызывающие инфекционный процесс у сельскохозяйственных животных, относят к одному виду — *Ch. psittaci*. Поэтому их основные биологические свойства очень сходные.

Морфология и тинкториальные свойства. Характерны для вида *Ch. psittaci*.

Культивирование. Осуществляют теми же методами, как и у возбудителей орнитоза: в желточных мешках куриных эмбрионов, культурах диплоидных и перевиваемых клеток. Размножение возбудителя происходит быстро и эффективно. Элементарные тельца, попавшие в цитоплазменные вакуоли клетки, превращаются в крупные ретикулярные (сетчатые) формы, которые растут и размножаются путем бинарного деления.

Устойчивость. Изучена мало. Предполагают, что вне организма животных возбудители активны лишь несколько дней. В воде при комнатной температуре сохраняют инфекционность 2–3 сут. Легко инактивируются при высоких и очень низких значениях рН. В лабораторных условиях сохраняются месяцами, а в высушенном состоянии (лиофилизация) — годами.

Патогенность. Хламидии вида *Ch. psittaci* патогенны для всех основных видов сельскохозяйственных животных (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади), а также для человека. Из лабораторных животных наиболее чувствительны белые мыши и морские свинки.

Патогенез. Заражение животных происходит в результате проникновения возбудителя алиментарным путем, со спермой, от больной матери плоду и новорожденным. Возможен аэрогенный путь заражения. У естественно инфицированных взрослых животных хламидиоз протекает вначале латентно: инкубационный период длится от 15–20 сут до 12 мес. и более. Обострение болезни вызывает беременность. На определенной стадии беременности хламидии локализуются и размножаются, вызывая воспаление и некрозы плаценты. Хламидии находятся также в тканях плода, паренхиматозных органах, вызывают отек подкожной соединительной ткани, оказывают токсическое воздействие на плод, что вызывает его гибель. Воспалительный процесс в матке и гибель плода приводят к аборту (у коров — на 4–9-м месяце беременности, у овец — за 2–7 нед. до срока окота, у свиноматок — в последние недели супоросности). Проникая в кровь больных животных, хламидии могут быть причиной пневмонии, энтеритов и полиартритов; иногда болезнь протекает латентно. Отмечают истощение животных, снижение молочной продуктивности, метриты, вагиниты и бесплодие. У самцов развиваются уретриты, орхиты, эпидимиты, импотенция.

Антигенная структура. У возбудителей хламидиозов антигенная структура сложная. Предполагают, что кроме группоспецифического и видоспецифического антигенов, характерных для вида *Ch. psittaci*, в оболочке частиц хламидии находятся антигены, специфические для штаммов каждого возбудителя.

Лабораторная диагностика. Хламидийные аборты и другие хламидиозы сельскохозяйственных животных диагностируют в основном серологическим методом. Для выделения

возбудителей хламидийного аборта используют abortированный плод или его паренхиматозные органы и желудок, экссудат из брюшной полости, котиледоны, выделения из шейки матки и влагалища abortировавшего животного.

При диагностике хламидийного аборта крупного рогатого скота суспензией патологического материала заражают естественно-восприимчивых животных: морских свинок, белых мышей и иногда суточных цыплят. У морских свинок при подкожном или внутрибрюшинном заражении (по 0,4–0,5 мл) через 7–8 сут повышается температура тела до 40,5°C, болезнь заканчивается летально. При вскрытии обнаруживают некрозы в печени, воспалительные изменения в легких, а также скопление серозного и фибринозного экссудата в брюшной полости. В экссудате обычно находят элементарные тельца возбудителя. Беременные морские свинки, как правило, abortируют через 10–20 сут после введения материала. Белые мыши чувствительны при разных способах заражения: интраназальном, внутримышечном (по 0,2 мл) и внутрибрюшинном (по 0,5 мл). В результате 60–80% мышей погибает через 6–8 сут. При вскрытии трупов обнаруживают увеличение печени, селезенки, геморрагии в легких, скопление темно-коричневого экссудата в брюшной полости (после внутрибрюшинного введения материала).

Серодиагностику осуществляют с помощью РСК (диагностически достоверен титр 1:10) и РИФ. Ретроспективная диагностика с помощью РСК основана на исследовании парных сывороток крови у abortировавших коров. Кровь берут сразу после аборта и через три недели после него. Обычно наблюдается значительное повышение титра антител (титры их к группоспецифическому антигену достигают 1:64–1:128). Гемагглютинирующие свойства возбудителя определяют в РГА и РЗГА, используя эритроциты белых мышей или кур.

Срок полного лабораторного исследования при диагностике хламидиоза составляет 1,5–2 мес. Предварительный диагноз на основании результатов микроскопического и серологического исследований может быть поставлен через трое суток после поступления патологического материала. При дифференциальной диагностике следует исключить бруцеллез, вибриоз, листериоз, сальмонеллез.

Иммунитет. Изучен недостаточно. Установлено, что в формировании его участвуют клеточные и гуморальные факторы. При хламидийном аборте в крови, молозиве, молоке коров выявляют комплементсвязывающие и нейтрализующие антитела, гемагглютинины, относящиеся к классам М и G. Однако их максимальные титры в сыворотке крови (1:64–1:128), отмечаемые до 20–24 сут (у экспериментально зараженных телок), быстро снижались; вторичный подъем титра происходил за 5–7 сут до аборта или после него. После аборта животные приобретают довольно стойкий иммунитет к реинфекции и могут давать полноценное потомство.

Овцематки в первые 2–3 года после появления хламидиоза в хозяйстве abortируют в 60% случаев, в последующие годы количество abortов снижается до 5%, в дальнейшем окоты у овец проходят нормально. Это свидетельствует о формировании у овец естественного активного иммунитета, обеспечиваемого комплементсвязывающими и нейтрализующими антителами, которые сохраняются у переболевших животных около 1,5 лет.

От взрослых животных (матерей) антитела передаются через молозиво молодняку, формируя таким образом у новорожденных телят, ягнят, поросят, жеребят пассивный колостральный иммунитет.

Биопрепараты. Для специфической профилактики хламидийного аборта рогатого скота и свиней испытан ряд экспериментальных вакцин: мертиолатвакцина, эмульсинвакцина (отечественные), формализированная адсорбатвакцина, инактивированная с масляным адъювантом вакцина (импортные). Однако эти вакцины пока не нашли широкого производственного применения.

Для лечения больных хламидиозом телят используют сыворотку реконвалесцентов. Получают такую сыворотку от животных-доноров, у которых обнаруживают специфические комплементсвязывающие антитела в высоких титрах.

ГЛАВА 15. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ И МИКОТОКСИКОЗОВ

Микроскопические грибы вызывают микозы — специфические болезни различных видов сельскохозяйственных животных, зверей, рыб, пчел, растений и человека. Грибы являются растительными гетеротрофными бесхлорофилловыми организмами, содержащими в клетках истинные ядра.

Микозы сельскохозяйственных животных в большинстве случаев вызывают: совершенные грибы из класса фикомицетов (*Phycomycetes*) — мукоровый гриб, или головчатая плесень (*Mucor*), пенициллиум, или кистевидная плесень (*Penicillium*), аспергилл, или леечная плесень (*Aspergillus*), дрожжеподобные грибы кандиды из рода *Candida*, возбудители кандидамикоза и эпизоотического лимфангоита (гистоплазмоза), возбудители трихофитии из рода *Trichophyton*, микроспории из рода *Microsporium*, фавуса (парши) из рода *Achorion*.

В основе систематики и классификации грибов лежат способности и характер их размножения. Известно около 100 тыс. видов грибов, объединенных более чем в 20 классов, которые, в свою очередь, подразделены на подклассы, порядки, семейства, роды, виды и штаммы.

Микозы известны давно, однако этиология их была установлена только после открытия возбудителей дерматофитозов — фавуса (1839) и микроспории (1843). Позднее были открыты другие возбудители микозов, но до сих пор признанной классификации не существует.

Известны три группы микозов животных, вызываемых патогенными грибами, которые поражают те или иные ткани.

1. Поверхностные микозы кожи и ее производных (волосы, ногти). Возбудители — грибы из родов *Trichophyton*, *Microsporium* и *Achorion*.

2. Глубокие микозы кожи, характеризующиеся появлением узлов в собственно коже и образованием язв по ходу лимфатических сосудов (возбудитель эпизоотического лимфангоита).

3. Висцеральные микозы с локализацией процесса в органах дыхания или других органах (возбудители гистоплазмоза, кокцидиоидомикоза, аспергиллеза, мукомормикоза).

15.1. ВОЗБУДИТЕЛИ ПЛЕСНЕВЫХ МИКОЗОВ

15.1.1. ВОЗБУДИТЕЛЬ МУКОРМИКОЗА

Мукомормикоз (*Mucormycosis*) — хроническое заболевание животных и человека, характеризующееся поражением органов дыхания и лимфатических узлов. Болезнь протекает без клинических признаков. При вскрытии обнаруживают желтоватые казеозно-известковые гранулемы. Нередко болезнь возникает на фоне других, например при туберкулезе.

Возбудители — *Mucor pusillus*, *Mucor racemosus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus nigricans*. Особенно патогенен гриб *A. corymbifera*.

Морфология. Мукоровая, или головчатая, плесень состоит из нерасчлененного мицелия в виде сильно разветвленной клетки, от которой поднимаются плодоносящие гифы с шаровидными спорангиями на конце в виде головки (отсюда и название «головчатая плесень»), в которые заключены эндоспоры, выполняющие функцию размножения. В тканях животных при окраске гематоксилин-эозином, метиленблау, по Цилю — Нильсену или Романовскому — Гимзе обнаруживают крупные, ветвящиеся, несептированные гифы мукоровых грибов.

Культивирование. Растут мукоровые грибы на тех же средах, что и другие возбудители грибных инфекций. Например, колонии гриба *A. corymbifera* на среде Сабуро вначале белые, с развитием мицелия приобретают темно-серый цвет. Мицелий

несептированный. Спорангиеносцы прямые или изогнутые, до $250 \times 2,5-11$ мкм. Спорангии $40-60$ мкм в диаметре, грушевидные, большей частью с коническим столбиком, $10-50$ мкм в диаметре. Споры шаровидные, бесцветные, $2,2-4,8$ мкм в диаметре. Оптимальная температура для развития — $25-30^\circ\text{C}$.

Устойчивость. Многие представители муковых грибов способны переносить высокую температуру. В самосогревающемся сене грибы способны расти при температуре $40-50^\circ\text{C}$. Большинство грибов широко распространены в природе, часто обнаруживаются на кормах, особенно на влажных. Их можно выделить из мяса, молока, масла, яиц, овощей, фруктов, хлебобулочных изделий. Обитают они в почве и постоянно присутствуют в воздухе.

Патогенность. Мукормикозом болеют собаки, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, норки и животные других видов. Для эпизоотологии мукормикоза характерно то, что он чаще возникает на фоне других инфекций (туберкулез, бруцеллез, стафило- и стрептококкозы). Заражение происходит аэрогенным или алиментарным путем.

Из лабораторных животных восприимчивы молодые морские свинки, у которых после заражения обнаруживают энтерит, гранулемы в почках, селезенке, легких и мезентериальных лимфоузлах.

Экспериментально мукормикоз воспроизведен на кроликах и мышах. У кроликов патогенность гриба *A. corymbifera* установил Лихтейм в 1950 г. При внутривенном введении суспензии спор кролики погибают на третьи сутки. При вскрытии находят увеличение печени и селезенки; в почках — сероватые некротические узелки. Слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта воспалена.

Гибель мышей, зараженных споровой суспензией в дозе $0,2$ мл, наступает через $3-7$ сут. При вскрытии трупов макроскопические изменения отсутствуют в гистопрепаратах. Наиболее сильные поражения обнаруживают в органах в виде гнойных фокусов.

Диагностика. Осуществляют на основании патологоанатомических данных (изучение гранулематозных образований и выделения из них возбудителя), микроскопии нативного материала, выделения чистой культуры и заражения лабораторных животных.

Для экспресс-диагностики и дифференциации от других гранулематозных образований используют мазки-отпечатки. Срезы окрашивают гематоксилин-эозином, метиленблау или по Романовскому — Гимзе.

Антигенная структура, иммунитет. Не изучены. Специфические методы диагностики и профилактики не разработаны.

15.1.2. ВОЗБУДИТЕЛИ ПЕНИЦИЛЛЕЗА

Пенициллез (*Penicilloles*) — болезнь человека и животных, сопровождающаяся поражением кожи, ногтей, ушей, верхних дыхательных путей и легких. Возможна генерализованная инфекция с образованием очагов во внутренних органах.

Основными возбудителями пенициллезозов являются *Penicillium crustaceum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium myce-tomagenum*, *Penicillium citrinum* и др. Все эти грибы принадлежат к классу *Fungi imperfecti*, порядку *Hyphales* и роду *Penicillium*.

Морфология. В пораженных органах и тканях пенициллы представлены многоклеточным мицелием с характерными органами спороношения, имеющими вид кисточек. Конидиеносец многоклеточный, в верхней части разветвлен, на концах его образуются стеригмы, от которых отшнуровываются четкообразные ряды колоний. Мицелий легко различим в свежих неокрашенных мазках из пораженных органов и тканей, разведенных в капле 10% -го гидроксида натрия.

Культивирование. Осуществляют на плотных питательных средах Чапека, сусле-агаре при 25–28°C. Идентифицируют по характеру колоний, микроскопии выросшей культуры.

Устойчивость. Пенициллы обладают достаточной устойчивостью к воздействию физико-химических факторов. Для обезвреживания их используют те же средства, что и при мукомольных и аспергиллезных.

Патогенность. Патогенные пенициллы поражают сельскохозяйственных животных практически всех видов, вызывая патологию как микозного, так и пенициллотоксикозного характера. Пенициллы продуцируют ряд токсинов (цитреовиридин, цитринин, пеницилловая кислота, патулин, рубратоксин,

охратоксин и др.), которые характеризуются общеплазматическим действием на животных и растительный организмы.

Пенициллоксикозы широко распространены во всех странах мира, но изучены еще недостаточно.

Лечение пенициллезоз осуществляют с помощью нистатина, в хронических случаях — амфотерицина В и аутовакцин.

15.1.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ АСПЕРГИЛЛЕЗА

Аспергиллез (*Aspergillois*) — острая или хроническая болезнь домашних и диких птиц, реже животных других видов, характеризующаяся поражением органов дыхания. В легких, трахее, воздухоносных мешках, иногда в органах брюшной полости находят фибриновые мелкие узелки различной формы и цвета, содержащие гифы мицелия грибов из рода *Aspergillus*.

Основным возбудителем аспергиллеза у птиц и млекопитающих является гриб *A. fumigatus*. Описаны микозные энзоотии среди цыплят, утят и индюшат, вызванные *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*. Эти грибы относятся к группе несовершенных грибов — *Fungi imperfecti*, порядку *Hyphales*, семейству *Aspergillaceae*, роду *Aspergillus*.

Различные виды аспергилл довольно часто обитают в организме здоровых животных. Снижение резистентности организма, ухудшение условий содержания и кормления способствуют заболеванию аспергиллезом.

Морфология. В неокрашенных препаратах, приготовленных из гноя, некротических очагов, экссудата, дифтеритических наложений со слизистых или из гранулематозных очагов, под покровным стеклом обнаруживают бесцветные, септированные гифы мицелия с характерными органами спороношения, конидиеносцы, стеригмы, цепочки конидий.

Микроскопировать можно препараты, окрашенные лактофуксином или метиленовой синью. В первом случае фон красный, а гифы мицелия синие, во втором — фон не окрашивается, гифы гриба голубые.

Культивирование. Для культивирования аспергилл применяют агар и среду Чапека. Температурный оптимум — 20–25°C, иногда 37°C; pH 5,0–6,5.

На агаре Сабуро *A. fumigatus* образует белые пушистые колонии, приобретающие впоследствии зеленую или желтую окраску; на агаре Чапека — гладкие или звездчатые зеленые или черные колонии. Конидиеносец одноклеточный, гладкий, 300–500 мкм в длину и 2–3 мкм в ширину. На его верхнем конце веерообразно расположен ряд коротких стеригм, от которых цепочками отшнуровываются споры — конидии (от *греч.* *κοινα* — пыль и *ειδος* — вид, образ). Конидии шаровидные, диаметром 2–4 мкм.

Гриб *A. flavus* на агаре Чапека образует желто-зеленые колонии; для колоний *A. niger* характерна темно-коричневая окраска.

При микроскопическом исследовании аспергилл расположение экзоспор в спороносящей части напоминает собой струйки воды, выливаемой из лейки, отсюда и название «леечная плесень».

Биохимические свойства. В организме птиц и млекопитающих патогенные аспергиллы выделяют протеолитические ферменты и эндотоксин, обладающий гемолитическими и токсическими свойствами.

Антигенная структура окончательно не изучена. Антигенными свойствами обладает эндотоксин, а также корпускулярные (конидиальные и мицеллярные) и растворимые (полисахаридные и белковые) антигены. Против этих антигенов получены иммунные сыворотки.

Устойчивость. Кипячение не инактивирует аспергиллы в течение 5–10 мин. В кормах, проросших грибом, устойчивость его возрастает; их обеззараживают при 160–180°C в течение 10 мин.

В качестве дезинфектантов, обезвреживающих аспергиллы, используют осветленные растворы хлорной извести, содержащие 2% активного хлора, 1,5% -й раствор креолина, 2,5% -й раствор фенола. Экспозиция не менее 3 ч. 2% -й раствор формальдегида убивает аспергиллы через 10 мин.

Патогенность. К аспергиллезу наиболее восприимчивы индейки, куры, цесарки, утки, пчелы, лошади, крупный рогатый скот, овцы, собаки, свиньи, кролики, морские свинки. Чаще болезнь развивается у молодых животных с пониженной резистентностью организма. Заражение происходит как аэрогенным, так и алиментарным путем. Так, споры грибов могут

проникать через неповрежденную скорлупу яиц с последующим развитием в белке, желтке и воздушной камере. Яйца могут поражаться в гнездах, во время сбора, хранения, транспортировки и в инкубаторах.

У крупного рогатого скота и других животных появление аспергиллеза обусловлено длительным стойловым содержанием, отсутствием моциона и скармливанием пораженного корма.

Диагностика. Окончательный диагноз ставят в лаборатории путем микологического исследования. В лабораторию направляют свежие трупы птиц, кусочки пораженных органов с характерными гранулематозными очагами, яйца; при поражении пчел — соты с больным и погибшим расплодом.

Патологический материал микроскопируют в капле 10% -й гидроокиси натрия с целью обнаружения мицелия гриба и высевают на среды Сабуро, Чапека, сусло-агар для выделения чистой культуры. Параллельно исследуют корма, подстилку, предметы ухода, овоскопируют яйца. Для дифференциации аспергилл разных видов дополнительно используют реакции агглютинации, преципитации, иммунофлуоресценции и иммуноэлектрофорез.

Остропротекающий аспергиллез цыплят необходимо отличать от пуллороза, а у взрослых птиц — от микоплазмоза, туберкулеза, гипоавитаминоза А и инфекционного бронхита.

Специфическая терапия и профилактика отсутствуют. Для лечения и профилактики используют йодистый калий, йодинол, люголевский раствор, антибиотики нистатин и амфотерицин, а также аэрозоли 1% -го раствора беренила в течение 3–4 сут при экспозиции 30 мин.

15.2. ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ДРОЖЖЕПОДОБНЫМИ ГРИБАМИ

15.2.1. ВОЗБУДИТЕЛИ КАНДИДАМИКОЗА

Кандидамикоз (*Candidamycosis*; кандидоз, молочница, соормикоз, поверхностный бластомикоз) — заразная болезнь животных и человека, характеризующаяся поражением слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и других

органов с образованием беловатых пленок наподобие творожистых наложений, а также гранулематозных образований во внутренних органах (ротовая полость, молочная железа, кишечник, легкие). Поражается и кожа.

Кандидамикоз вызывается дрожжеподобными грибами из рода *Candida*, главным образом *Candida albicans*. Паразитируют и другие грибы — *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*. Возбудитель обнаружен Б. Лаугенбеком в 1839 г. в тканях больного человека. В 1843 г. Робин дифференцировал его и назвал *Oidium albicans*.

Морфология. Кандиды — дрожжеподобные грибы, представляют собой одноклеточные микроорганизмы, продуцирующие псевдомицелий, мицелий, бластоспоры, вертициллы, гломерулы, псевдоконидии. В отличие от истинных дрожжей кандиды не образуют аски (сумки). Характерным морфологическим признаком *C. albicans* служит способность образовывать на средах с тканевыми экстрактами хламидоспоры (споры с плотной двойной оболочкой) различных размеров.

Кандиды — относительно крупные микроорганизмы (от 1,5×1,5 до 6–10 мкм). Хорошо окрашиваются простыми методами, по Граму, Романовскому — Гимзе. Грибы можно исследовать и в неокрашенном состоянии в капле воды или глицерина.

Культивирование. Кандиды — аэробы, хорошо растут на плотных и жидких средах при pH 6,0–6,5, а также при pH 2,5–3,0. Оптимальная температура 21–27°C.

На сусло-агаре через 1–5 сут *C. albicans* формирует круглые, сметанообразные, плоские и выпуклые, блестящие, иногда матовые, с ровными краями колонии, состоящие из дрожжевидных клеток, крепко вросших в субстрат. В жидкой среде рост глубинный (помутнение, осадок, пленки, пристеночное кольцо).

На агаре Литмана колонии выпуклые, часто конусовидные, маслянистые, блестящие, вначале гладкие (S-форма), позже шероховатые (R-форма). Окраска колоний от темно-синей до пурпурной.

А. В. Милихина с соавт. (1988) для выделения *C. albicans* из клинического материала предложила сухую селективную среду кандида-агар.

Биохимические свойства. Кандиды сбраживают глюкозу, лактозу, рафинозу, лакмусовое молоко и левулезу с образованием

кислоты и газа. Некоторые штаммы не сбраживают сахарозу, что используют для дифференциации различных грибов рода *Candida*.

C. albicans на висмут-дрожжевой среде формирует черные колонии, что также отличает его от других грибов. Продуцирует эндотоксин, вызывающий гибель лабораторных животных. Убитые формалином (0,5% -й раствор) культуры гриба через 48 ч вызывают гибель при внутрибрюшинном введении у 21-суточных мышей.

Антигенная структура. *C. albicans* представляет собой белковую фракцию. Гриб продуцирует гликопротеин. Под воздействием физико-химических факторов может менять морфологическую структуру, диссоциировать в гладкие (S) и шероховатые (R) колонии, а также изменять биохимические и антигенные свойства.

Устойчивость. Грибы хорошо выдерживают высушивание и замораживание. В стерильной воде и почве выживают до 12 мес., а в нестерильной — до 3–7 мес. При нагревании до 60°C грибы гибнут в течение 5–10 мин. Ультрафиолетовое излучение убивает дрожжеподобные грибы через 10–15 мин; рассеянный свет — в течение 14 сут.

Из химических средств фунгицидным действием обладают 2% -й формалин, препараты йода, раствор люголя, йод-глицерин, 1% -й раствор хлорида йода, 5% -й раствор фенола, хлорамин, 10% -й раствор лизола и др.

Патогенность. Гриб продуцирует токсин — кандидатоксин. Вирулентные штаммы грибов из рода *Candida* вызывают инфекцию у индюшат, цыплят, гусят, утят в возрасте до трех месяцев, реже у поросят, ягнят, телят, щенков. В лабораторных условиях вирулентность *C. albicans* определяют на мышах, кроликах, морских свинках, крысах, куриных эмбрионах 9–10-суточного возраста. Весьма восприимчивы к грибу дикие голуби.

Введение 24–48-часовой свежевыделенной культуры *C. albicans* внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно обуславливает развитие острого или хронического заболевания. Развитие и исход болезни зависят от степени вирулентности гриба, способа введения, дозы, вида, возраста и режима кормления лабораторных животных.

При вскрытии трупов лабораторных животных могут быть обнаружены абсцессы в печени, селезенке, почках, некротические очаги в корковом слое почек, лимфоцитемия без атрофии лимфатической системы.

Внутриголовное введение культуры гриба обуславливает генерализованную инфекцию, а подкожное — местный процесс.

Куриные эмбрионы при заражении на хорион-аллантоисную оболочку в дозе 0,2 мл суспензии гриба погибают в течение 24–48 ч.

Возникновению болезни способствует снижение защитных свойств организма животных в результате несбалансированного кормления и неудовлетворительного содержания в сырых, тесных, плохо проветриваемых помещениях. Длительное применение антибиотиков, сульфаниламидов и витаминов повышает вирулентность *C. albicans*. Нередко кандидамикоз возникает как вторичная болезнь при туберкулезе и дисбактериозах.

Иммунитет. Иммунобиологическая перестройка организма при кандидамикозе до конца еще не изучена. У лабораторных животных, зараженных *C. albicans*, отмечено образование агглютининов, преципитанов и комплементсвязывающих антител. В процессе адаптации к организму кроликов *C. albicans* усиливают иммуногенные свойства.

Диагностика. Основана на микроскопическом исследовании патологического материала, где обнаруживают в большом количестве развитый мицелий, псевдомицелий и бластоспоры. Для подтверждения патогенности грибов ставят биопробу на кроликах, белых мышах или цыплятах суточного возраста.

Необходимо дифференцировать от туберкулеза, авитаминозов и незаразных желудочно-кишечных болезней.

Биопрепараты отсутствуют. Больных животных лечат йодистыми препаратами, антибиотиками (нистатин, микостатин, фунгицидин), которые дают с простоквашей из расчета 25–50 мг/кг массы в течение десяти дней. Крупным животным, пораженным кандидами, скармливают трихомицин в дозе 200 тыс. ЕД на 1 кг массы животных.

15.2.2. ВОЗБУДИТЕЛЬ КОКЦИДИОМИКОЗА

Кокцидиоидомикоз (*Coccidioidomycosis*) — контагиозная заразная болезнь многих видов животных, характеризующаяся гранулематозным (локальным или диссеминированным) поражением органов дыхания и регионарных лимфатических узлов.

Кокцидиоидомикозом поражается и человек; болезнь называется кокцидиоидальной гранулемой и до сих пор малоизучена. Возбудитель — гриб *Coccidioides immitis*, относится к классу *Deutermycetes (Fungi imperfecti)*.

Морфология. Гриб *C. immitis* — толстостенный дрожжеподобный микроорганизм, в тканях и экссудатах имеющий сферическую форму (сферулы). Размер сферул в диаметре колеблется от 20 до 200 мкм. Сферулы содержат эндоспоры от 2 до 5 мкм в диаметре. После разрыва оболочки сферулы эндоспоры обсеменяют окружающую ткань, где прорастают и образуют новые сферулы. В культуре гриб представлен ветвящимся септированным мицелием, распадающимся на многочисленные артроспоры.

Культивирование. Гриб — аэроб. Хорошо растет на многих питательных средах при 20–37°C в виде пушистого мицелия. На агаре Литмана образует белые хлопьевидные колонии с неровными краями.

На глюкозном агаре Сабуро при 20°C (рН 5,6) рост появляется через 3–4 сут, а при 37°C — в течение суток. Молодой воздушный мицелий имеет вид белых пушистых хлопьев; по мере старения культура становится рыхлой, рыжевато-бурого или желтого цвета. В этот период (период споруляции) культура особенно опасна для окружающих. Гриб можно культивировать на куриных эмбрионах.

Биохимические свойства. Гриб *C. immitis* на третий день разжижает желатин, пептонизирует и коагулирует молоко.

Устойчивость. Споры гриба устойчивы к физико-химическим воздействиям. Кипячение культур и патологического материала обезвреживает его в течение 20 мин. Сферулы в гное сохраняют жизнеспособность до 240 сут. В физиологическом растворе споры выживают при 4°C 6 мес.

В качестве дезинфектантов чаще всего используют 5–10% -й раствор формальдегида, хлорамина, фенола, фенолятов натрия.

Патогенность. К кокцидиоидомикозу восприимчивы крупный рогатый скот, свиньи, собаки, овцы, ослы, кошки, кролики, обезьяны, кенгуру, белки и др. Заболевшие животные являются источником возбудителя грибной инфекции. Заражение происходит аэрогенным путем через пыль, содержащую споры возбудителя, иногда алиментарным путем.

Экспериментально кокцидиоидомикоз можно воспроизвести у крупного рогатого скота, овец, свиней, собак, кроликов, морских свинок и мышей. Формы и тяжесть болезни зависят от способа заражения, дозы материала и вида животных. У крупного рогатого скота, зараженного подкожно, в регионарных узлах образуются абсцессы, а у морских свинок, кроликов, собак развивается общее заболевание.

Болезнь зарегистрирована в США, Венесуэле, Аргентине, Парагвае, Италии. В России описано несколько случаев заболевания людей, у животных кокцидиоидомикоз не установлен.

Иммунитет. Животные, переболевшие легко в раннем возрасте, приобретают иммунитет. Специфическая терапия и профилактика отсутствуют. Больных собак уничтожают.

Диагностика включает микроскопию препаратов из патологического материала и выделенных культур, микологический анализ выращенных культур, заражение восприимчивых лабораторных животных, аллергические и серологические исследования.

Кровь, гной, некротические ткани микроскопируют в капле 10%-го раствора гидроксида натрия или калия, смеси спирта с глицерином или раствора люголя 2%-й концентрации. Обнаружение в неокрашенных препаратах характерных для гриба сферул с толстой оболочкой, заполненных эндоспорами, дает право поставить предварительный диагноз.

Микологический анализ заключается в выделении чистых культур гриба. Высевы патологического материала проводят на агар Сабуро, МПА или в бульон с глюкозой. Желательно к средам добавлять антибиотики (пенициллин — 20 ЕД на 1 мл, стрептомицин — 40 ЕД на 1 мл), которые задерживают рост многих видов бактерий, но не оказывают бактериостатического действия на *C. immitis*.

Заражение лабораторных животных проводят с целью получения тканевой фазы гриба *C. immitis*. Морским свинкам (самцам) вводят в тестикулы суспензию гриба из культуры: на седьмой день развивается гнойный орхит. Из экссудата, извлеченного с помощью шприца, готовят препараты-мазки и исследуют их под микроскопом. Мышей заражают солевой суспензией из культуры гриба внутрибрюшинно.

Аллергическая диагностика. Используют аллерген кокцидиоидин — фильтрат культуры гриба *C. immitis*, предложенный Девисом в 1947 г. В настоящее время для приготовления кокцидиоидина используют несколько штаммов гриба *C. immitis*, выращиваемых на аспарагиновой среде. Аллерген, разведенный 1:100, вводят внутрикожно в дозе 0,1 мл. Реакцию учитывают через 48 ч и оценивают по тем же критериям, что и при туберкулезе.

Серологическая диагностика. Осуществляют с помощью реакции иммунопреципитации в агаровом геле, реакции агглютинации и реакции связывания комплемента. В качестве антигенов применяют полисахаридный антиген при РП, кокцидиоидин при РСК и убитую культуру при РА.

Специфическая профилактика отсутствует.

15.2.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭПИЗОТИЧЕСКОГО ЛИМФАНГОИТА

Эпизоотический лимфангоит (*Lymphangoitis epizootica*) — африканский сап, бластомикоз, гистоплазмоз, лимфангоит — хроническая заразная болезнь цельнокопытных животных, характеризующаяся воспалением лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки с образованием гнойных очагов и язв. Возбудитель — дрожжевидный гриб *Cryptococcus* (*Histoplasma*) *farciminosus*, открытый в 1873 г. С. Ривольта.

Морфология. В патологическом материале криптококки представляют собой округлые, овальные, яйцевидные почкующиеся тельца с заостренными с одной или обеих сторон концами и двухконтурной оболочкой. Размеры криптококков от 2,5 до 4 мкм в длину и 2–3 мкм в ширину.

Протоплазма криптококков гомогенная и содержит преломляющие свет включения (зернышки, палочки), находящиеся в беспрерывном движении. Криптококки располагаются одиночно или большими кучками. Часть из них находится в макрофагах и лейкоцитах.

В чистой культуре гриб имеет септированный мицелий с гифами, ветвящимися в виде почек. Отдельные гифы распадаются на клетки цилиндрической формы, образуя зрелые криптококки. Ширина мицелия 4 мкм.

Протоплазма криптококков хорошо окрашивается по Граму, Романовскому — Гимзе и Новикову; двухконтурная оболоч-

ка не окрашивается. Не окрашиваются и мертвые криптококки. Неокрашенные криптококки можно четко различать.

Культивирование. Для культивирования гриба предложены различные плотные и жидкие среды: пептонно-печеночный агар, МПА с 2% глюкозы и 2,5% глицерина; агар Сабуро; бульон из лошадиного мяса, обогащенный глюкозой (2,5%) и глицерином (2%); растительные среды (картофель, сено и др.). Развитию гриба способствует добавление в питательные среды 10% лошадиной, кроличьей, овечьей или бычьей крови. Первичные культуры криптококков растут медленно, последующие пере-seвы дают обильный рост. Оптимальная температура — 28–30°C; при 37°C рост замедляется или отсутствует.

Антигенная структура. В качестве антигенов для постановки РСК служат экстракты из культур криптококков. После первичного инфицирования криптококками у больных животных отмечаются положительные реакции на аллергены (гистоплазмин, бластомицин, криптококковый аллерген), полученные из культур мицелия гриба или его криптококковой формы.

Устойчивость. Криптококки устойчивы к воздействию физико-химических факторов. В сухих гнойных корках сохраняются до 5 лет; в почве и навозе мицелий разрушается через 2–2,5 мес.

Нагревание до 65°C в течение 1 ч не обезвреживает криптококки. Прямые солнечные лучи убивают гриб через 10 сут; 5% -й раствор карболовой кислоты — через 1 ч; 2,5% -й раствор формалина, 3% -й раствор гидроксида натрия — за 25 мин; 10% -й раствор антиформина — за 5 мин. Форма возбудителя после воздействия химических веществ не изменяется.

Патогенность. В естественных условиях эпизоотическим лимфангоитом болеют цельнокопытные — лошади, мулы, ослы, иногда верблюды и даже крупный рогатый скот. Лабораторные животные устойчивы к криптококкам. При заражении их гноем на месте инъекции возможно образование абсцесса. Белые мыши при подкожном заражении погибают через 1–3 сут; из крови сердца и органов можно изолировать возбудителя эпизоотического лимфангоита.

Лошадей заражают введением материала от больного животного или культуры криптококков. В этом случае болезнь характеризуется воспалением лимфатических сосудов, формированием гнойных фокусов с превращением их в язвы, которые

располагаются на конечностях. Иногда к основному возбудителю присоединяются возбудители секундарных инфекций, что приводит к септицемии и гибели животного.

Описано несколько случаев эпизоотического лимфангоита у людей.

Диагностика. Диагноз устанавливают на основании эпизоотических данных, клинических признаков и микроскопии содержимого гноя, абсцессов и язв. Каплю исследуемого материала помещают на предметное стекло в 50% -й водный раствор глицерина.

Под микроскопом обнаруживают овальные клетки с двухконтурной оболочкой (криптококки). Первичную культуру гриба получают при высеве гноя на печеночный агар и инкубировании посевов при 28–30°C в течение 2–3 нед.

Для выявления болезни на ранних стадиях и в предклинический период прибегают к аллергическому методу исследования лошадей, используя криптококковый аллерген, гистоплазмин или бластомицин. Аллергены вводят внутрикожно в дозе 0,3–0,4 мл в среднюю треть шеи лошади. Оценивают реакцию через 48–72 ч по наличию болезненной припухлости на месте введения препаратов.

Эпизоотический лимфангоит необходимо дифференцировать прежде всего от сапа путем маллеинизации и постановки РСК и от язвенного лимфангоита, при котором поражения локализуются преимущественно на конечностях, а в гное из язв присутствуют грамположительные палочки.

Иммунитет. Переболевшие животные приобретают пожизненный иммунитет. Средства специфической профилактики болезни не разработаны. Лечение больных осуществляют антисептиками.

15.3. ВОЗБУДИТЕЛИ ДЕРМАТОМИКОЗОВ

15.3.1. ВОЗБУДИТЕЛИ ТРИХОФИТИИ

Трихофития (*Trichophytia*) — трихофитоз, стригущий лишай — заразная болезнь, характеризующаяся появлением на коже резко ограниченных безволосых очагов с шелушащейся чешуйчатой поверхностью или с выраженной воспалительной реакцией кожи и фолликулов.

Заболевание у животных вызывают грибы, относящиеся к роду *Trichophyton*. У крупного рогатого скота трихофитию вызывают *Tr. faviforme* и *Tr. tonsurans*. В нашей стране крупный рогатый скот чаще всего поражает гриб *Tr. verrucosum*.

Возбудитель паразитирует в волосах и на коже в виде разветвленного септированного мицелия, который распадается на споры.

Лошадей поражают грибы *Tr. equi* и *Tr. gypseum* овец — *Tr. verrucosum var. autotrophicum*, отличающиеся от гриба, поражающего крупный рогатый скот, культурально-морфологическими признаками и динамикой роста на разных питательных средах.

Культивирование осуществляют на глюкозном агаре, среде Сабуро или сусле-агаре при pH 6,5–6,8, температуре 26–28°C или комнатной (18–20°C).

Tr. faviforme — медленнорастущий гриб. На агаре Сабуро образует кожистые колонии, пуговчатые в центре, с глубинным ростом в питательную среду. На сусле-агаре колонии желтовато-белые, восковидные, в центре возвышенные, с глубокими складками и плотными лучистыми краями. Иногда колонии кожистые, покрытые белоснежным густым пушком. Гриб формирует мицелий различной толщины и округлые или четырехугольные артросторы, расположенные цепочками.

Tr. tonsurans (Tr. crateriforme) — на агаре Сабуро образует белые или желтые колонии, округлой формы; в центре кратерообразные, мучнистые, по периферии бархатистые. В культурах мицелий ветвящийся с многочисленными грушевидными спорами, расположенными гроздевидно на нитях мицелия или на нем непосредственно. В старых культурах встречаются хламидоспоры. На сусле-агаре колонии мучнистые, по периферии бархатистые, поверхность их складчатая, часто с кратеровидной впадиной в центре. Цвет колоний белый, с возрастом становится кремовым.

Tr. equi — на агаре Сабуро образует колонии в виде белого, реже кремового пушистого налета; с обратной стороны имеют ярко-вишневую окраску. На сусле-агаре колонии белые, бархатистые, плоские, с возрастом появляются радиальные бороздки. Старые колонии мучнистые. По бокам гиф формируются хламидоспоры.

Tr. gypsum — быстрорастущий гриб, полиморфный. На сусле-агаре колонии плоские, ровные, приподнятые в центре в виде маленького бугорка, с мучнистой поверхностью белого цвета с переходом в желтоватый, с обратной стороны колонии имеют красную пигментацию. В культурах мицелий гриба тонкий, разветвленный, с обильными спиральными и кольцевидными окончаниями гиф и многочисленными гроздевидными, округлыми спорами. На среде Сабуро колонии правильной округлой формы, мучнистые, как бы посыпанные порошком гипса. Цвет белый, обратная сторона колоний желтая или коричневая. В центре колоний пуговчатое возвышение.

Tr. verrucosum (var. autotrophicum) — колонии появляются на сусле-агаре через 20–25 сут. Первичная культура имеет вид белых, тонких и округлых колоний расплывчатой формы, с паутинообразным краем, складчатостью в центре и бархатисто-пушистой поверхностью. Иногда колонии выпуклые, рыхлые или плоские и распростертые, а также округлые, плоские с ровным краем, белые, бархатисто-пушистые, в диаметре от 5–7 до 10–25 мм.

Мицелий септированный, прямой, изогнутый, извилистый, гребешковый, диаметром 3–9 мкм; содержит единичные артроспоры или распадается на артроспоры 2,5–6, реже 10–12 мкм в диаметре. Микроконидии округлой, грушевидной, палочкообразной формы, шириной 1,5–2,5 и длиной 5–7 мкм. Макроконидии с обрубленными краями и одной перегородкой, овальной или неправильной формы, размером 3,5×15–25 мкм. Могут встречаться единичные терминальные и интеркалярные хламидоспоры размером 7–13×30 мкм (М. П. Парманов, 1988).

Антигенная структура у дерматофитов неодинаковая. Споры и мицелий трихофитонов содержат полисахаридные и протеиновые антигены.

Устойчивость. Находясь под защитой рогового слоя волоса, возбудители трихофитии сохраняют патогенность до 4–7 лет, а споры — до 9–12. При температуре 60–62°C гриб погибает в течение 2 ч, а при 100°C — за 15–20 мин.

При воздействии щелочного раствора формальдегида в соотношении 1:2, горячего 10% -го раствора серно-карболовой смеси при двукратном нанесении грибы погибают в течение 1 ч.

Патогенность. Трихофитией поражаются крупный рогатый скот (особенно телята), лошади, собаки, кошки, ослы, мулы, свиньи, овцы, звери. Из лабораторных животных болеют морские свинки, кролики, мыши, крысы, куры.

У человека трихофитию вызывают *Tr. tonsurans*, *Tr. rubrum*, *Tr. mentagrophytes* и др. Возможно заражение от животных — *Tr. faviforme*, *Tr. gypseum*, *Tr. verrucosum*.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Животные, переболевшие трихофитией в первый год жизни, повторно не болеют. Зарегистрированы отдельные случаи естественной невосприимчивости животных как к трихофитии, так и к микроспории.

Биопрепараты. Для специфической профилактики трихофитии в неблагополучных хозяйствах используют вакцины ТФ-130 или ЛТФ-130. Телятам их вводят в область крупа двукратно, с интервалом 10–14 сут в дозах 5, 8, 10 мл, в зависимости от возраста. Через месяц у них формируется длительный иммунитет не менее четырех лет.

Больных животных изолируют и лечат с помощью юглона, препарата РОСК, однохлористого йода, фенотиазина, трихотецина; условно здоровых вакцинируют.

15.3.2. ВОЗБУДИТЕЛИ МИКРОСПОРИИ

Микроспория (*Microsporiasis*) — микроспороз, стригущий лишай — заразная болезнь кожи и волос, клинически характеризующаяся образованием очагов поверхностного воспаления кожи, обламыванием волос и поражением ногтей.

Возбудители микроспории — грибы из рода *Microsporum*: *M. lanosum* (пушистый микроспорум), *M. equinum* (лошадиный микроспорум), *M. gypseum* (гипсовый микроспорум). Мицелий грибов прямой, разветвленный, септированный. По мере развития гриба распадается, образуя округлые, резко преломляющие свет споры 3–4 мкм в диаметре. На поверхности и внутри волоса споры располагаются беспорядочно в виде мозаики.

Культивирование. *M. lanosum* — возбудитель микроспороза у собак и кошек. На сусле-агаре через 2–3 сут после посева появляются круглые с концентрическими кругами серовато-

белые колонии; с возрастом центр колоний становится мучнистым. Обратная сторона колоний желтая. При микроскопировании культуры виден септированный, разветвленный гребешковидный мицелий. *M. equinum* — возбудитель микроспороза лошадей. На среде Сабуро образует кожистые, складчатые колонии, покрытые серо-белым септированным воздушным мицелием. Цвет зрелых колоний желтый или коричневый, обратная сторона желтая. Микроконидии грушевидные, редкие. Макроконидии многоклеточные (15–20×12–17 мкм). *M. gypseum* — возбудитель микроспороза у лошадей, собак, кошек, крыс, мышей. На сусле-агаре дает плоские, с возрастом мучнистые, неправильно-складчатые колонии. Цвет колоний темноватый, светло-коричневый, обратная сторона рыжеватокоричневая.

Мицелий ракетообразный с большим количеством микроконидий. Макроконидии есть или не обнаруживаются. Пораженные волосы флюоресцируют в результате продуцирования грибом флюоресцирующего пигмента — интеридина (Wolf, 1957).

Антигенная структура изучена мало. Установлено, что у различных грибов антигенная структура неодинаковая. Положительную кожную реакцию у иммунизированных кроликов вызывает только протеиновая фракция.

Устойчивость. Микроспорумы в пораженных волосах, кожных соскобах способны сохраняться до 2–5 лет. В сухожаровых камерах при 140°C гриб погибает за 30 мин, при 80°C — за 2 ч, при кипячении — за 2–3 мин. Под действием 3%-го раствора формальдегида и 5–8%-х растворов гидроксида натрия — в течение 20–30 мин.

Спецодежду обеззараживают кипячением в 2%-м мыльно-содовом растворе в течение 15 мин или замачивают в 5%-м растворе хлорамина (3 ч), 5%-м растворе лизола (20 мин). Спецодежду и предметы ухода лучше обезвреживать в пароформалиновой камере в течение 40–50 мин.

Патогенность. *M. equinum* вызывает микроспороз у лошадей в естественных условиях и в эксперименте. Из лабораторных животных чувствительна морская свинка, в скарифицированную кожу которой втирают культуру гриба или патологический материал (пораженные волосы, кожные соскобы); возможно заражение человека.

С целью дифференциации грибов рода *Microsporum* от *Trichophyton* у кошек и собак используют люминесцентный метод: исследуемый материал рассматривают под ультрафиолетовым излучением ртутно-кварцевой лампы типа ПРК-2 или ПРК-4 с фильтром Вуда на расстоянии 20 см в затемненной комнате. Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение, споры трихофитон не светятся.

Лечение. Для специфической профилактики применяют вакцину «Ментовак». С лечебной целью используют мазь юглон или 2% -ю мазь перихотецина на рыбьем жире, препарат РОСК. На протяжении 2–3 нед. с кормом задают гризеофульвин из расчета 25–30 мг на 1 кг живой массы.

15.3.3. ВОЗБУДИТЕЛИ ФАВУСА (ПАРШИ)

Фавус (*Favus*) — белый гребень — инфекционная болезнь птиц, реже млекопитающих и человека, характеризующаяся поражением кожного покрова в виде белых плотных налетов (фавусных щитков), состоящих из мицелия и спор гриба *Achorion gallinae*; развитием фолликулитов и разрушением сальных и потовых желез. У человека паршу вызывает *Achorion schoenleini*.

Морфология. В соскобах с пораженных участков гребня птиц виден тонкий мицелий, состоящий из прямоугольных клеток с двухконтурной оболочкой. Споры гриба округлые или многогранные, располагаются цепочками или группами величиной 4–8 мкм.

Культивирование. *A. gallinae* культивируют на агаре Сабу-ро при 25–30°C. Растет он медленно, начиная с 4–5 сут. Молодые колонии гладкие, бархатистые, белые; зрелые — складчатые, мучнистые, морщинистые, похожие на губку, крошковатые. Колонии бывают розового, розово-красного или малинового цвета. Пигмент появляется при температуре до 30°C, в пересеянных культурах нередко отсутствует.

В молодых культурах мицелий у гриба тонкий (1,5–2 мкм) и септированный. Рост на питательных средах в виде гребешков, рогов северного оленя, канделябра, веретенообразных вздутий. Мицелий зрелых культур диаметром 5 мкм состоит из цепочек, разнообразных по форме и размеру, превращающихся впоследствии в хламидоспоры.

Макроконидии — 1–6-клеточные, микроконидии — грушевидные, размером от 3,5 до 5 мкм. В культурах грибок характеризуется полиморфизмом.

Патогенность. В естественных условиях болеют домашние и дикие птицы, главным образом молодняк, особенно петушки. Описан случай фавуса, вызванного *A. gallinae* у человека. Кроме птиц к фавусу восприимчивы мыши, крысы, кролики, собаки, кошки.

У птиц различают скутулярную (генерализованную) и висцеральную формы фавуса. Очаги поражения обнаруживают на гребешке, сережках, возле клюва. Вначале появляются маленькие круглые белые пятна, затем узелки. Последние увеличиваются и превращаются в серовато-белые скутулы (струпьевидные корочки с углублением в центре). Генерализованная форма характеризуется обширным поражением кожного покрова, носоглотки, горла, пищевода и тонких кишок. При висцеральной форме у птиц развивается стойкая диарея, они худеют и погибают.

Диагностика. Микроскопическое исследование плотного белого налета с пораженных участков кожи или основания перьев. В исследуемом материале находят скопление мицелия и круглых многогранных спор гриба.

Биопрепараты не разработаны. Пораженные участки кожи (скутулы) размягчают 3–5% -й креолиновой мазью, затем обрабатывают 4–6% -м раствором формальдегида, 2% -м раствором перманганата калия или 5% -м раствором салицилового спирта. Процедуры повторяют через каждые 3–4 сут до выздоровления.

15.4. ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОТОКСИКОЗОВ

Микотоксикозы — болезни, возникающие у сельскохозяйственных животных после поедания кормов, загрязненных токсинами, вырабатываемыми микроскопическими грибами. Различают две группы микотоксикозов:

- отравления токсинами грибов, паразитирующих на вегетирующих растениях;
- отравления токсинами грибов-сапрофитов, поражающих корма во время их хранения.

15.4.1. ВОЗБУДИТЕЛИ АСПЕРГИЛЛОТОКСИКОЗОВ

Аспергиллотоксикозы (*Aspergillotoxicosis*) — алиментарные микотоксикозы сельскохозяйственных животных, возникающие при скармливании им кормов, пораженных аспергиллами. Грибы из рода *Aspergillus* распространены повсеместно.

Широко встречаются и более детально изучены аспергиллотоксикозы, вызываемые токсинами грибов *Aspergillus fumigatus* — аспергиллофумигатотоксикоз и *Aspergillus flavus* — аспергиллофлавитоксикоз (афлатоксикоз).

Морфология и культивирование грибов описаны в разделе «Возбудители аспергиллеза».

Токсинообразование. Грибы рода *Aspergillus*, продуцируя токсины, вызывают аспергиллотоксикозы.

A. fumigatus — возбудитель аспергиллофумигатотоксикоза — типичный представитель микрофлоры почв, зерна, грубых кормов — продуцирует более десятка токсинов: фумигалин, фумигатин, фумигацин, мигалин, глиотоксин, спинулозин, коевую и гельволевую кислоты, трипадицин.

Установлено, что токсинообразование не всегда совпадает с процессом спорообразования, накопление токсических веществ идет параллельно росту и развитию гриба как на пораженных кормах (особенно на сене), так и на искусственных средах Чапека, сусле-агаре, глюкозопептонной среде.

A. flavus — возбудитель аспергиллофлавитоксикоза — продуцирует особо опасные токсины — афлатоксины, обладающие гепатотропным и канцерогенным действиями. По химической природе афлатоксины — производные кумарина. В их состав входят до десяти токсических компонентов: А, В, В₂, М₁₅ М₂, Р и др. Для утят и кроликов ДД-50 токсина В₁ составляет 0,4 мг/кг, В₂ — 1,7 мг/кг. Афлатоксин В₁ признан наиболее сильным канцерогеном: доза 1,56 мг у утят вызывает цирроз печени.

Микотоксины аспергиллов обладают местным и общим действиями. Местный процесс характеризуется воспалением кожи, слизистых оболочек. Общее действие проявляется поражением центральной нервной системы за счет повреждающего действия токсинов на мембраны нервных клеток, нарушением процессов иммуногенеза.

Лабораторная диагностика. Для исследования в лабораторию направляют паренхиматозные органы погибших животных, соскобы с некротических участков, а также пробы подопольных кормов. Проводят микроскопию и микологическое исследование кормов, а также проверку их токсичности на лабораторных животных.

Для установления афлатоксинов используют экспресс-методы, в частности методы тонкослойной хроматографии и ИФА.

Биопрепараты. Специфические средства лечения и профилактики отсутствуют.

15.4.2. ВОЗБУДИТЕЛИ ФУЗАРИОТОКСИКОЗА

Фузариотоксикозы (*Fusariotoxicoses*) — алиментарные микотоксикозы, вызываемые грибами рода *Fusarium*, содержащимися в кормах. Отравление животных наблюдают при пастыбе по стерне осенью или на лугах с молодой травой ранней весной после заморозков. Грибы рода *Fusarium* относятся к порядку гифомицетов (*Hyphales*), классу несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*), семейству *Tuberculariaceae*.

В настоящее время выделено три типа фузариотоксикозов: споротрихиеллотоксикозы (Р2-токсикоз), фузариограминеаротоксикозы и фузарионивалетоксикозы, возбудителями которых являются соответственно *F. sporotrichiella*, *F. graminearum*, *F. nivale*.

Морфология. У грибов рода *Fusarium* мицелий септированный, хорошо развит, белого, розового или красного цвета. Микроконидии одноклеточные, с одной или тремя перегородками, овальные, яйцевидные, грушевидные или лимоноподобные, иногда шаровидные или веретенообразные. Образуются на воздушном мицелии и располагаются на конидиеносцах в виде головок или цепочек, длиной 3–6 мкм.

Макроконидии многоклеточные (3–9 клеток), веретеновиднo-серповидные, часто с ножкой у основания, с верхушечной клеткой, большей частью сильно согнутой или постепенно утолщающейся, заостренной или притупленной. В воздушном мицелии они образуются на конидиеносцах или в спородохиях.

Хламидоспоры шаровидные, грушевидные, яйцевидные, одно- двухклеточные, располагаются цепочкой или в клубоч-

ках на концах гиф (терминальные) или по ходу мицелия (интеркалярные). Образуются в гифах мицелия, в строме, конидиях, конидиеносцах. Цвет их коричневый. Строма окрашена в желтый, розовый, красный, коричневый цвета.

Некоторые представители этого рода имеют и сумчатые стадии.

Культивирование. Фузарии выращивают на среде Чапека. Подозрительное зерно светло-серого или розового цвета помещают на среду и инкубируют при 22–25°C. В течение 3–5 сут на среде вырастают пышные желтоватые колонии, которые пересевают на сусло-агар или картофельный агар с целью получения чистой культуры, которую исследуют под микроскопом, определяя морфологические особенности макроконидий, наличие микроконидий, их формы, образование хламидоспор, пигментацию.

Токсинообразование. Грибы рода *Fusarium* продуцируют различные токсины. Из *F. sporotrichiella* var. *poae* получены кристаллические вещества: поин, липотоксол, спорофузарин, поэфузарин, спорофузариногенин и поэфузариногенин. Эти же грибы продуцируют токсические метаболиты, которые относятся к группе трихотеценов: токсин Т-2 и диацетоксискирпенол. В природных условиях токсин Т-2 образуется при поражении грибом зерна, особенно кукурузы, грубых кормов. Наличие токсина Т-2 определяют с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в хлороформенных и ацетоновых экстрактах из мицелия гриба и пораженных фузарием субстратов. Токсины гриба *F. sporotrichiella* и его разновидностей устойчивы к действию физических и химических факторов.

F. graminearum продуцирует комплекс токсических метаболитов, способен вызывать аборт, а также бесплодие у крупного рогатого скота и свиноматок.

F. nivale (штамм Fn2B) продуцирует два токсина, вызывающих тошноту, сонливость и геморрагии, поражение клеток мозговой ткани мышей и кроликов: фузаренон X и ниваленол, которые относятся к группе трихотеценов типа Б. Токсические метаболиты из культуры фузария и пораженных им субстратов экстрагируют метанолом.

Патогенность. К фузариотоксикозам восприимчивы сельскохозяйственные животные всех видов. Токсины грибов,

поступая с кормом в пищеварительный тракт, проникают в кровеносную систему и разносятся по всему организму. В первую очередь поражается центральная нервная система, затем желудочно-кишечный тракт, паренхиматозные органы, костный мозг. Развиваются экссудативные дерматиты, атрофия тимуса и другие явления.

Диагностика включает комплексное исследование с учетом анамнеза, клинических, патологоанатомических данных и токсикомикологического анализа кормов. Токсичность корма, пораженного грибами, проверяют на кроликах с помощью кожной реакции или путем подкожного заражения белых мышей, а также на простейших.

Некоторые исследователи для целей диагностики рекомендуют использовать аквариумных рыбок, 1,5–2-месячных цыплят, 9-суточные куриные эмбрионы; введение экстракта в дозе 0,1–0,2 мл в бородку курам.

Для серологического диагноза используют РСК, РП и иммунодиффузии.

Биопрепараты. Для специфической профилактики и терапии фузариотоксикозов не разработаны.

15.4.3. ВОЗБУДИТЕЛЬ СТАХИБОТРИОТОКСИКОЗА

Стахиботриотоксикоз (*Stachybotryotoxiecosis*) — остро-, реже подостропротекающий микотоксикоз сельскохозяйственных животных, возникающий при поедании кормов, пораженных токсическим грибом *Stachybotrys alternans*, растущим главным образом на сене и соломе. Могут заболеть и люди.

Гриб относится к несовершенным грибам *Fungi imperfecti*, к роду *Stachybotrys*; существуют токсические и нетоксические варианты гриба.

Морфология. Мицелий септирован (поперечными перегородками), многоклеточный. От мицелия вверх развиваются спороносные гифы, конидиеносцы со стеригмами и сидящими на них конидиями. Толщина гиф зависит от возраста и достигает 2–3 мкм. Конидиеносцы бесцветные, гладкие, в верхней части бородавчатые, оливково-бурого цвета, 45–52 мкм длиной и 4 мкм в диаметре. Стеригмы яйцевидные, розеткообразные, по 6–8 лепестков булавовидной или яйцевидной формы. Конидии лег-

ко опадающие, одноклеточные, яйцевидные, темно-коричневого или черного цвета, длиной 8–12 и шириной 6–8 мкм (рис. 40).

Культивирование. В естественных условиях гриб растет на влажных растительных кормах, богатых целлюлозой (солома, сено, зерно, силос), и в почве. На естественных субстратах образует черный, сажистый, легко снимающийся налет.

Для искусственного культивирования используют жидкие и плотные питательные среды (агаровую среду Чапека, Сабуро, сусло-агар и среду Ван-Итерсона). В жидких средах гриб дает поверхностный рост, вначале в виде пристеночного кольца, а с 5–6 сут в виде пленки. Среда остается прозрачной. На плотных средах (среда Сабуро, агар Чапека) вырастают двухзонные колонии, в центре складчатые, черного цвета; на периферии колонии образуется белая каемка. Колонии непросвечивающиеся, овальной формы. Сама среда постепенно окрашивается в черно-коричневый цвет. На фильтровальной бумаге со средой Ван-Итерсона на 7–12-е сутки образуется черный, иногда с зеленоватым оттенком, сажистый налет. Оптимальная температура для роста и развития гриба 20–27°C, влажность 45–50%. Органы плодоношения развиваются через 50–70 сут.

Биохимические свойства. Возбудитель стахиботриотоксикоза является типичным разрушителем целлюлозы.

Токсинообразование. Образование и накопление токсинов в пораженных грибом субстратах, а также на питательных средах идет параллельно процессу накопления биомассы и пигмента и заканчивается одновременно с окончанием роста гриба. Из культуры гриба *S. alternans* выделен стахиботриотоксин, повреждающий кожу; токсин В-3, блокирующий сердечную мышцу; роринин Е и верукарин I. Токсин стабилен при хранении,

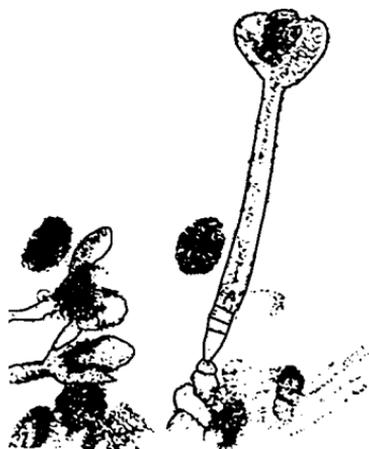


Рис. 40
Конидиеносец Stachybotrys alternans, заканчивающийся розеткой булавочновидных стеригм, ×100

устойчив к нагреванию, высушиванию, действию рентгеновского и ультрафиолетового излучений.

Двухчасовая обработка пораженного корма в автоклаве при 112°C ведет к полному разрушению токсических веществ. Нейтрализация их достигается 0,5% -м раствором NaOH, 1% -м раствором аммиака и 5% -й суспензией извести. Дрожжевание и молочнокислое брожение не детоксифицируют пораженный корм.

Устойчивость. Споры *S. alternans* до 6 мес. сохраняют жизнеспособность в почве, скирдах соломы и стеблях растений, а при достаточной влажности и плюсовой температуре прорастают. При температуре -35°C гриб сохраняет жизнеспособность. Прямые солнечные лучи, воздействующие в течение 10–15 мин, замедляют прорастание конидий гриба; рассеянный свет, рентгеновское и ультрафиолетовое излучения почти не оказывают на них влияния.

При воздействии текучим паром гриб на влажной соломе гибнет в течение 2–3 мин. Сухой жар (120°C) убивает конидии в течение 1 ч, горячая вода (88°C) — за 30 мин.

Отмечено фунгицидное действие на гриб и его споры 2% -го раствора NaOH на протяжении 1 ч; 2% -го раствора карболовой кислоты — 30 мин; 1% -го — 1 сут; 0,5% -го — 2 сут; 5% -го раствора аммиака — 30 мин.

Патогенность. К стахиботриотоксикозу восприимчивы лошади, свиньи и жвачные. Вспышка стахиботриотоксикоза отмечена у буйволов после скармливания вместе с силосом соломы, пораженной грибом. Описаны случаи стахиботриотоксикоза у лосей, бизонов и других диких животных. Отмечено, что младеняк молочного периода не болеет.

В основе патогенеза лежит действие токсинов, которые из пищеварительного тракта поступают в кровеносную и лимфатическую системы и разносятся по всему организму. Через несколько часов токсин поражает центральную нервную систему, вызывает глубокие изменения в кроветворных органах и сосудистой системе. В кровеносных сосудах возникают воспалительные и некротические процессы — стенки сосудов становятся дряблыми и порозными. Отмечаются множественные кровоизлияния на слизистых и серозных покровах.

Изменения физико-химических свойств крови приводят к нарушению кровообращения, возникают гиперемия, геморра-

гический диатез, отек легких, уменьшается количество тромбоцитов, что приводит к замедленному свертыванию крови. Патологические изменения развиваются в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, печени.

Лабораторная диагностика. Диагноз на стахиботриотоксикоз ставят на основании учета эпизоотологических данных (поражение корма, массовое появление болезни, сезонность, отсутствие заболеваний у молодняка, высокая летальность и др.), результатов клинического и гематологического исследований, патологоанатомического вскрытия и микологического исследования кормов.

В лабораторию посылают пробы соломы, сена и зернофуража, покрытые черным сажистым налетом, массой 20–30 г каждая. Кроме того, на исследование отправляют кал лошадей, а от погибших — пораженные участки кишечника, преджелудков, костный мозг, печень, кровь. Исследование включает микроскопию, выделение гриба *S. alternans* из кормов и определение его токсичности.

Для микроскопии темный налет соскабливают и помещают на предметное стекло в каплю 5% -го водного раствора глицерина, накрывают покровным стеклом и рассматривают при малом и среднем увеличении. В поле зрения видны темноокрашенные конидиеносцы, стеригмы и конидии. Вместо глицерина можно использовать дистиллированную воду.

Для получения чистой культуры отбирают соломинки с черным налетом и нарезают кусочки длиной 1,5–2 см. Эти соломинки или пораженные зерна помещают в стерильные бактериологические чашки с фильтровальной бумагой, увлажненной жидкой средой Чапека, и инкубируют при 24–26°C. Через 3–4 сут (в положительном случае) развиваются морфологические элементы, характерные для гриба *S. alternans*; через 7–12 сут — интенсивный темнопорошистый сажистый налет, который пересевают петлей на агар Чапека. На 5–7-е сутки выросшую культуру исследуют под микроскопом и на токсичность.

Токсичность определяют методом кожной пробы на кролике. Для этого 50 г пораженной грибом измельченной соломы помещают в бумажные патроны из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Сокслета серным эфиром в течение 6 ч. Эфир отгоняют, полученный экстракт переносят в сосуд и

конденсируют при комнатной температуре до испарения эфира. Вместо эфира можно использовать ацетон, хлороформ или другие органические растворители. Полученный экстракт двукратно наносят на выбритую поверхность кожи кролика размером 3×3 см. Если исследуемая солома содержит токсин, то на месте нанесения экстракта через 3–4 сут появляется воспалительная реакция в виде гиперемии, отечности тканей с последующим развитием некроза. На контрольном участке кожи с другой стороны у того же кролика при втирании экстракта из непораженной соломы видимые изменения отсутствуют. Чтобы кролик не слизывал нанесенный на кожу экстракт, ему надевают специальный воротник.

Биопрепараты. Специфические средства терапии и профилактики отсутствуют. В случаях необходимости используют симптоматическую лекарственную терапию (детоксицирующие и вяжущие средства).

Контрольные вопросы и задания к 14–15 главам*

1. К какому семейству и роду относится возбудитель болезни?
2. Как называется возбудитель?
3. Какие виды возбудителей существуют?
4. Как называются болезни, вызываемые отдельными возбудителями, и какие животные восприимчивы?
5. Охарактеризуйте возбудителей (размеры, особенности морфологии и химического состава).
6. Какова устойчивость возбудителя к действиям физико-химических и биологических факторов?
7. Какими антигенными свойствами обладает возбудитель?
8. Каковы морфологические и культуральные особенности возбудителя?
9. Каковы биологические свойства и спектр патогенности возбудителей?
10. Какие методы используют для дифференциации одного возбудителя от других?
11. В чем заключается особенность патогенеза заболевания?
12. Какова схема микробиологической диагностики возбудителей инфекционных болезней?

* Приведенные вопросы касаются всех возбудителей инфекционных болезней, рассматриваемых в этом разделе.

13. Как проводится бактериологическая диагностика инфекционных болезней?
14. Какой патологический материал берут прижизненно и посмертно?
15. Какой метод окрашивания возбудителя применяют для определения формы, спор, капсул и других особенностей?
16. Как определяется подвижность микробов?
17. Какие питательные среды используют для культивирования и каков характер роста бактерий в жидких и на плотных средах?
18. Каковы особенности выделения чистой культуры (отношение к кислороду, температуре и сроку выращивания)?
19. Каковы биохимические свойства возбудителя?
20. На каких животных и как ставят биологическую пробу?
21. Какие серологические методы существуют для обнаружения антигена и идентификации возбудителя?
22. При каких заболеваниях используют аллергический метод диагностики?
23. Как называется аллерген?
24. Какие биопрепараты используют для диагностики, лечения и профилактики болезни, вызываемой конкретным возбудителем?

РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ

**САНИТАРНАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ**

ГЛАВА 16. УЧЕНИЕ О САНИТАРНО– ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМАХ

Основными источниками распространения возбудителей большинства инфекционных болезней, поражающих человечество, являются люди и теплокровные животные. Наиболее массивное выделение ими микроорганизмов в окружающую среду происходит воздушно-капельным и фекальными путями.

Санитарно-микробиологическое исследование объектов окружающей среды обязано решить вопрос о наличии или отсутствии в них опасных для человека микроорганизмов. Непосредственное обнаружение возбудителя инфекционных болезней в объектах окружающей среды (несмотря на то, что в настоящее время разработаны методы прямого, ускоренного и количественного их определения) имеет целый ряд трудностей.

Во-первых, патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде постоянно. Сравнительно легко их можно обнаружить в период эпидемий, но очень трудно в межэпидемические периоды. Основная же деятельность санитарных микробиологов направлена на предупреждение возникновения эпидемий, и поэтому вся работа ведется в межэпидемические периоды.

Во-вторых, количество патогенных микроорганизмов, попавших в окружающую среду, значительно уступает непатогенным и распространение их в загрязненных объектах неравномерно. Трудности возникают и при выделении патогенных микробов при посевах на питательные среды, даже ингибиторные, поскольку они неизбежно страдают от конкуренции сапрофит-

ной микрофлоры. Отрицательные результаты индикации патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорят с достоверностью об их отсутствии. Поэтому приходится подходить к оценке различных объектов непрямым путем, устанавливая факт загрязнения человека или теплокровных животных их выделениями. И чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Сообщающиеся с внешним миром полости тела людей и животных обильно заселены нормальной микрофлорой, довольно постоянной по качественному составу и сравнительно мало изменяющейся при инфекционных заболеваниях. Для многих видов микроорганизмов (обитателей тела здорового человека) полость рта или кишечник являются биотопами — единственной средой обитания. Поэтому находки таких микробов вне организма свидетельствуют о загрязнении соответствующими выделениями. Находя в исследуемом материале представителей микрофлоры полости рта, мы вправе думать о попадании слизи из дыхательных путей, в которой могут содержаться и возбудители скарлатины, туберкулеза и др., а обнаруживая нормальных обитателей кишечника, можно делать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей кишечных инфекций. Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, и поэтому названы «санитарно-показательными». Однако не все микробы, входящие в состав нормальной флоры тела человека или животных, могут быть признаны санитарно-показательными.

На основании многочисленных исследований были сформулированы требования, которым должны отвечать санитарно-показательные микроорганизмы.

1. Они должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах.
2. Они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных.
3. После выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам

выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями.

4. Они не должны размножаться в окружающей среде.

5. Они не должны сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.

6. Они должны быть достаточно типичными, с тем, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда.

7. Индикация, идентификация и количественный учет должны производиться современными, простыми, легко доступными и экономичными микробиологическими методами.

Поскольку два первых признака считались решающими, то длительное время кишечную палочку признавали индикатором фекального загрязнения, а зеленеющий стрептококк — показателем воздушно-капельного загрязнения.

Преимущество бактерий группы кишечных палочек (БГКП) связано с их свойствами, которые соответствуют основным требованиям, предъявляемым к санитарно-показательным микроорганизмам: они являются постоянными обитателями кишечника человека и животных, выделяются в окружающую среду с фекалиями, их выживаемость и устойчивость в окружающей среде несколько превышают подобные свойства патогенных энтеробактерий, они не обладают способностью размножаться ни в почве, ни в воде.

Преимущество БГКП заключается еще и в том, что в загрязненных объектах количество их превалирует над всей остальной кишечной флорой. Они признаются бактериологами всего мира основным показателем фекального загрязнения и, следовательно, косвенным индикатором эпидемической опасности объектов окружающей среды. Однако в ряде случаев при обнаружении превышения нормативных показателей контаминации БГКП проводятся дополнительные исследования показателей свежего фекального загрязнения (наличие кишечной палочки, энтерококков, колифагов), и обнаружение энтерококков подтверждает факт свежего фекального загрязнения: они быстрее отмирают в окружающей среде и в то же время более устойчивы к действию пестицидов и детергентов.

В настоящее время в категорию санитарно-показательных (индикаторных) микроорганизмов включены представители

кишечной микрофлоры человека: БГКП, фекальные кишечные палочки (ФКП), к которым в основном относятся *E. coli*, бактерии группы протей, клостридии (*C. perfringens*), *E. faecalis*, колифаги. Показателями биологического загрязнения воздуха помещений являются стрептококки и стафилококки.

В связи с развитием микробиологии и микробиологических методов исследования начался поиск новых индикаторных микроорганизмов. Так, к числу микроорганизмов, которые составляют основную анаэробную флору кишечника человека, принадлежат бифидобактерии. Однако трудности при индикации и культивировании анаэробных бифидобактерий пока не позволяют использовать их как индикатор фекального загрязнения.

Непосредственное определение патогенных микроорганизмов в окружающей среде методически трудоемко и не всегда доступно. Поэтому правильно определять наличие санитарно-показательных микроорганизмов и проводить индикацию патогенных бактерий только тогда, когда этого требует эпидемическая ситуация.

16.1. ПРИНЦИПЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Принципы, которыми руководствуются микробиологи при санитарно-микробиологических исследованиях, исходят из основной задачи, разрешаемой ими: определение возможности присутствия в исследуемом объекте патогенных микроорганизмов или токсинов, образующихся при их жизнедеятельности, а также обнаружение и оценка степени порчи пищевых продуктов.

Первый принцип — правильное взятие проб для санитарно-микробиологических исследований с соблюдением всех необходимых условий, регламентированных для каждого исследуемого объекта, и правил стерильности. Ошибки, допущенные при взятии проб, приводят к получению неправильных результатов, и исправить их уже нельзя. При упаковке и транспортировке проб необходимо создавать такие условия, чтобы не допустить гибели или размножения исходной микрофлоры в исследуемом объекте, что может исказить результаты исследований.

Поэтому одним из правил является возможно быстрое проведение исследований, и, если необходимо, сохранение материала только в условиях холодильника и не более 6–8 ч. Каждая проба сопровождается документом, в котором содержится название исследуемого материала, номер пробы, время, место взятия, характеристика объекта, подпись лица, взявшего пробу.

Второй принцип — проведение серийных анализов исходит из особенностей исследуемых объектов. Как правило, вода, почва, воздух и другие объекты содержат разнообразные микроорганизмы, распределение которых неравномерно. К тому же микроорганизмы, находясь в биоценотических отношениях, подвергаются взаимному влиянию, что ведет к гибели одних и активному размножению других. Поэтому берут серию проб из разных участков исследуемого объекта (по возможности большое количество проб), что позволит получить более достоверную характеристику объекта. Доставленные в лабораторию пробы смешивают, затем точно отмеряют необходимое количество материала — среднее по отношению к исследуемому материалу в целом.

Третий принцип — повторное взятие проб, необходимое для получения сопоставимых результатов. Это связано прежде всего с тем, что исследуемые объекты весьма динамичны (вода, воздух и т. п.), сменяемость микрофлоры в них во времени и пространстве очень велика. Патогенные микроорганизмы попадают в окружающую среду, как правило, в небольшом количестве и распределяются в ней неравномерно. Поэтому повторное взятие проб позволяет более точно определить биологическую контаминацию объектов окружающей среды.

Четвертый принцип — применение стандартных и унифицированных методов, утвержденных соответствующими ГОСТами и инструкциями, что дает возможность получить сравнимые результаты.

Пятый принцип — использование при оценке исследуемых объектов одновременно комплекса тестов для получения разносторонней санитарно-микробиологической характеристики. Применяют прямой метод обнаружения патогенных микроорганизмов и косвенный, позволяющий судить о загрязнении объектов окружающей среды выделениями человека и животных и об его степени. К косвенным тестам относится определе-

ние общего микробного числа, количественного и качественно-го состава санитарно-показательных микроорганизмов.

Шестой принцип заключается в проведении оценки исследуемых объектов по совокупности полученных результатов при использовании санитарно-микробиологических тестов других гигиенических показателей, указанных в соответствующих ГОСТах и нормативах (органолептических, химических, физических и т. д.). Всегда необходимо учитывать, что развитие микробов тесно связано с другими факторами окружающей среды, которые могут оказывать как благоприятное, так и неблагоприятное влияние, усиливая или ограничивая возможности размножения патогенных микроорганизмов и накопления их токсинов. К тому же почти любой объект исследования имеет собственную микрофлору, которая вызывает специфические биохимические процессы, и те изменения в объектах, которые обуславливаются посторонними микроорганизмами. Санитарный микробиолог должен хорошо знать ход биохимических процессов, происходящих в норме и в исследуемом объекте (сырье, пищевые продукты, готовое изделие и т. д.), технологию производства, уметь определить характер вредного воздействия попавших микробов, возможные последствия такого воздействия и рекомендовать конкретные мероприятия по их предупреждению. Нередко врачу приходится прибегать к помощи специалистов в области общей, сельскохозяйственной, промышленной, ветеринарной микробиологии и решать вопрос при непосредственном участии соответствующих специалистов.

Седьмой принцип — ответственность врачей санитарной службы за точность обоснования выводов и заключений о состоянии исследуемых объектов. При санитарно-микробиологическом исследовании выявляется степень порчи пищевых продуктов (или других объектов), пригодность их к употреблению, возможная опасность для здоровья населения. Если пищевые продукты возможно реализовать, врач должен дать обоснованную рекомендацию о наиболее рациональном способе их обработки и употребления. Закрытие предприятия из-за санитарного неблагополучия наносит определенный экономический ущерб, а ответственность за такое решение несет врач санитарной службы. Для большей объективности в оценке полученных результатов и в заключениях врачи пользуются специальными

инструкциями, нормативами, ГОСТами, разработанными профильными санитарно-микробиологическими учреждениями и утвержденными Министерством здравоохранения. Эти стандарты периодически пересматриваются и приводятся в соответствие с изменениями, которые вытекают из практического опыта, материальных возможностей, современного уровня знаний и развития техники.

16.2. МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Современная санитарная микробиология при индикации и идентификации санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов, при определении общей микробной обсемененности объектов окружающей среды стремится использовать все те методы, которые применяются в диагностических микробиологических лабораториях:

- микроскопический — при индикации и прямом подсчете микроорганизмов в исследуемом объекте;
- бактериологический — выделение микроорганизмов и их идентификация;
- биологический — заражение чувствительных животных и ускоренные методы исследований (РИФ и др.).

Для получения разносторонней и полноценной санитарно-микробиологической характеристики объектов окружающей среды, как правило, используется комплекс тестов. К ним относится определение общей микробной обсемененности или количества МАФAM (мезофильных аэробных факультативно-анаэробных микроорганизмов). Общая микробная обсемененность объекта характеризуется количеством микроорганизмов в 1 мл воды, жидкости или в 1 г твердого вещества (продукта). Определение количества МАФAM является косвенным методом и позволяет судить о возможности загрязнения изучаемого объекта патогенными микроорганизмами.

Существует два метода определения общей микробной обсемененности: метод прямого подсчета под микроскопом; метод количественного посева различных разведений образцов и проб исследуемого объекта.

Первый проводится под микроскопом в счетных камерах Горяева или в камерах, специально сконструированных для подсчета бактерий. Предварительно пробу исследуемого объекта подвергают обработке, чтобы получить гомогенную взвесь. Для лучшего учета бактерий в исследуемую суспензию добавляют краситель. Второй метод применяется наиболее часто: из приготовленных серийных десятикратных разведений исследуемой жидкости или суспензии по 1 мл переносят в стерильные чашки Петри. Работу начинают с большего разведения, каждое разведение проводят отдельной пипеткой, исследуемый материал заливают расплавленным и охлажденным до 50°C мясопептонным агаром (метод горячей заливки).

Следует отметить, что оба метода определения общей микробной обсемененности являются относительными и приближительными. Для получения сравнимых результатов при определении общего микробного числа исследования проводятся по стандартным, конкретным для каждого случая методикам, регламентированным соответствующими ГОСТами.

Выявление в каждом конкретном случае виновника порчи исследуемой продукции и объекта окружающей среды ведется по схемам и методам, разработанным для каждой группы микроорганизмов.

Контрольные вопросы и задания

1. Почему трудно обнаружить патогенные микроорганизмы в окружающей среде?
2. Чем являются биотопы для некоторых микроорганизмов?
3. Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Какие из них признаются основными показателями фекального загрязнения?
4. К чему приводят ошибки, допущенные при взятии проб исследуемого материала?
5. Почему при взятии пробы необходимо брать большое количество проб?
6. Перечислите методы санитарно-микробиологических исследований.
7. С какой целью определяют количество МАФАМ?

ГЛАВА 17. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ПОЧВЫ, НАВОЗА

17.1. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА

С санитарно-микробиологической точки зрения воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться. В воздухе нет питательных веществ и влаги, солнечные лучи оказывают бактерицидное действие. Тем не менее, в воздухе постоянно имеются пигментообразующие кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов.

Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный характер и зависит от многих факторов. Так болезнетворные микробы попадают в воздух с пылью из почвы и с выделениями больных людей и животных. Воздух помещений загрязняется во время сухой уборки, чихания и кашля. При этом капли аэрозоля, находящиеся в воздухе, служат источником аэрогенного заражения окружающих. Скорость оседания капель зависит от диаметра аэрозоля.

Бактериальные аэрозоли представлены тремя фазами.

1. Крупнокапельная фаза с диаметром частиц аэрозоля более 0,1 мм; длительность пребывания таких частиц в воздухе — несколько секунд, капли быстро оседают.

2. Капельно-ядерная фаза, имеющая диаметр частиц 0,1 мм и менее. Частицы длительно находятся в воздухе и рассеиваются на большие расстояния с потоками воздуха. С ними рассеиваются различные микроорганизмы, в том числе и болезнетворные.

3. Фаза бактериальной пыли имеет частицы разного диаметра от 1 мм до 0,01 мм. Эта фаза имеет наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, так как она длитель-

но находится во взвешенном состоянии и глубоко проникает в дыхательные пути. Аэрогенным путем инфекционные заболевания передаются, главным образом, в закрытых помещениях.

Выживаемость патогенных микроорганизмов, находящихся во взвешенном состоянии, зависит от биологических свойств возбудителя, а также температуры и влажности воздуха. Например, возбудители туберкулеза, сибирской язвы, хорошо переносящие высушивание, длительное время сохраняются в окружающей среде.

Микробиологическое исследование воздуха проводят для определения МАФМ, т. е. общего микробного числа и количества санитарно-показательных микроорганизмов посевом на поверхность МПА; количество санитарно-показательных микробов определяют посевом на кровяном агаре, желточно-солевом агаре. Для определения наличия спор плесеней и дрожжей используют сусло-агар или среду Сабуро, Чапека.

Существует много методов бактериологического исследования воздуха, самыми доступными являются методы Коха и Кротова.

17.1.1. СЕДИМЕНТАЦИОННЫЙ МЕТОД КОХА

Суть седиментационного метода (от *лат.* *sedimentum* — осадок) заключается в осаждении микробных частиц и капель аэрозоля на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести.

Методика: чашки Петри с МПА, средой Сабуро оставляют открытыми на 5–20 мин в исследуемом помещении (классе, в цехах молочного завода, мясокомбината и т. д.). Чашки закрывают и помещают в термостат при 30°C, если это МПА или кровяной агар, их культивируют в течение 48 ч; если это среда Сабуро — культивируют при 25°C в течение 4–7 сут. Затем проводят подсчет выросших колоний во всей чашке. Далее определяют количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха по формуле Омелянского, согласно которой в чашки с питательной средой площадью 100 см², в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$x = \frac{A \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{S \cdot 10 \cdot T},$$

где x — количество микробов в 1 м^3 (1000 л) воздуха; A — количество выросших колоний в чашках; S — площадь чашки (80 см^2); 5 — время экспозиции по правилу Омелянского; T — время, в течение которого чашка была открыта; 10 — количество воздуха по правилу Омелянского; 1000 — 1 м^3 воздуха; 100 — 100 см^2 питательной среды.

17.1.2. АСПИРАЦИОННЫЙ МЕТОД КРОТОВА

Метод является более точным, так как прибор снабжен микроанометром, показывающим (объем) количество литров посеянного воздуха. Аппарат Кротова — это цилиндрический прибор, внутри которого имеется электромотор с центробежным вентилятором. При вращении вентилятора из исследуемого помещения воздух засасывается через узкую клиновидную щель в крышке прибора. Под крышкой прибора находится вращающаяся платформа с чашкой Петри, струя воздуха ударяется о влажную поверхность питательной среды, микроорганизмы из воздуха оседают. Чашки с посевами помещают в термостат на 24 – 48 ч при 300°C . Подсчет колоний производят так же, как и при седиментационном методе. В дальнейшем число микробов в 1 м^3 воздуха определяют по формуле

$$x = \frac{A \cdot 1000}{b},$$

где x — число микробов в 1 м^3 воздуха; A — число выросших колоний; b — количество посеянного воздуха.

Требования, предъявляемые к микробиологическим показателям воздуха, представлены в таблице 9 (исследования проводят 1 раз в месяц).

В каждой бактериологической лаборатории имеется бокс для проведения посевов и пересевов, воздух в боксе следует про-

Таблица 9

Микробиологические нормативы санитарного состояния воздуха производственных помещений

Метод исследования	МАФАМ, КОЕ, не более	Плесневые грибы, КОЕ, не более
Метод Коха	200 колоний за 20 мин	20 колоний за 20 мин
Метод Кротова	150 колоний в 100 л	15 колоний в 100 л

верить на бактериальную загрязненность не менее двух раз в неделю, к качеству воздуха в боксе предъявляются особые требования. Для проведения исследования чашки Петри с МПА и средой Сабуро оставляют открытыми в боксе на 15 мин, а затем чашки со средой МПА выдерживают в термостате 48 ч при 37°C, а чашки со средой Сабуро — 96 ч при 25–27°C. Допускается наличие 5 колоний плесени в чашках.

17.2. САНИТАРНО–МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

Почва является естественной средой обитания многих видов микроорганизмов. В ней имеются все условия для благоприятного их развития: достаточное количество влаги, органических и минеральных веществ. Почвенные микроорганизмы участвуют в минерализации органических отходов, самоочищении почвы, в круговороте веществ в природе.

В почву с выделениями больных, а также с трупами животных, погибших от инфекционных болезней, со сточными водами попадают патогенные микроорганизмы. В связи с этим почва может служить источником распространения возбудителей инфекционных болезней, через почву загрязняются объекты окружающей среды, может происходить обсеменение сапрофитными и болезнетворными микроорганизмами сырья животного происхождения, пищевых продуктов, кормов.

В почве могут быть патогенные бактерии, продолжительность их выживания зависит от вида и условий внешней среды. Особое место занимают спорообразующие возбудители почвенных инфекций (сибирской язвы, злокачественного отека, эмфизематозного карбункула, столбняка, ботулизма), которые сохраняются в почве годами, а возбудитель сибирской язвы — десятки и сотни лет.

Краткий санитарно-микробиологический анализ почвы включает определение следующих показателей: количество МАФМ в 1 г; коли-титра почвы; в отдельных случаях — например, при строительстве детских лагерей, новых животноводческих помещений — в почве определяют наличие возбудителей сибирской язвы, для исключения старых сибиреязвенных захоронений.

Отбор проб почвы. На обследуемой территории до 1000 м³ выделяют два участка по 25 м² каждый: один участок выбирают

вблизи, другой — вдали от источника загрязнения. С каждого участка отбирают среднюю пробу, составленную из 5 образцов, взятых по диагонали. Образцы берут на глубине до 20 см, при исследовании почвы скотомогильников — ниже глубины захоронения не менее чем на 25 см. Пробы отбирают стерильной железной лопатой или специальным буром в стерильные широкогорлые банки, которые закрывают ватными пробками. К банке приклеивают этикетку с датой и номером образца.

Масса каждого образца должна быть 200–300 г, а смешанного — не менее 1 кг. Отобранные пробы почвы направляют в лабораторию и исследуют сразу же или не позднее, чем через 12–18 ч при обязательном хранении в холодильнике.

17.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАФАМ В 1 Г ПОЧВЫ МЕТОДОМ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

В производственных лабораториях в колбу емкостью 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят 30 г исследуемой почвы, затем колбу с содержимым встряхивают в течение 10 мин. Из полученного разведения почвы $1:10^{-1}$ готовят последующие десятикратные разведения: для чистых почв $1:10^{-2}$ до $1:10^{-4}$, для загрязненных — до $1:10^{-6}$ и более.

В учебном классе удобнее делать разведения в пробирках, для этого первое разведение готовят внесением 1 г исследуемой почвы в пробирку с 9 мл стерильной воды, из полученного первого разведения $1:10$ переносят 1 мл во вторую пробирку с 9 мл воды, получается разведение $1:10^{-2}$ и т. д. до 10^{-6} (в результате этих разведений уменьшается концентрация бактерий и при посеве в чашки Петри появятся изолированные колонии, подсчет которых облегчается и становится точным).

Из двух последних разведений почвы (10^{-5} и 10^{-6}) берут по 1 мл и переносят в стерильные чашки Петри (не менее двух чашек на каждое разведение), которые заливают 13–15 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА, тщательно перемешивают (метод горячей заливки). Посевы культивируют в термостате 24–48 ч при 30°C .

Учету подлежат чашки Петри, в которых выросло от 30 до 300 колоний. Колонии считают в каждой чашке отдельно, определяют среднеарифметическое число по двум чашкам. Полу-

ченное число колоний умножают на степень разведения исследуемой почвы и получают число бактерий в 1 г почвы.

Результаты выражают в «колониобразующих единицах» — КОЕ/мл, г.

17.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА ПОЧВЫ МЕТОДОМ БРОДИЛЬНЫХ ПРОБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕДЫ КЕССЛЕРА

Исследования проводят в три этапа. На первом этапе готовят разведения: для чистых почв от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-3}$; для загрязненных — от $1:10^{-3}$ до $1:10^{-6}$. После тщательного перемешивания 1 г почвы по 1 мл полученной суспензии из различных разведений переносят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы культивируют при 43°C в течение 48 ч (при такой температуре дает рост *E. coli* только теплокровных).

На втором этапе исследования просматривают посевы на среде Кесслера. Из пробирок с помутнением и наличием газа делают высев на среду Эндо штрихом, для получения изолированных колоний. Посевы культивируют при 37°C в течение 24 ч.

На третьем этапе исследуют колонии, выросшие на среде Эндо. Для этого выбирают изолированные колонии, типичные для бактерий БГКП, готовят из них мазки, красят по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках коротких граммотрицательных палочек проводят высев из этих колоний на среду Кесслера для подтверждения газообразования в чистой культуре. В таблице 10 приведены санитарно-бактериологические показатели почвы, имеющей различную микробную загрязненность.

Таблица 10

Санитарно-бактериологические показатели почвы

Почва	Количество МАФ АМ, млн в 1 г	Титр кишечной палочки	Титр анаэробов (<i>Cl. perfringens</i>)
Чистая	1–1,5	1,0 и выше	0,2 и выше
Слабо загрязненная	2	0,1–0,01	0,1–0,01
Умеренно загрязненная	2,5–3	0,01–0,001	0,01–0,0001
Сильно загрязненная	Свыше 3–5	0,001 и ниже	0,0001 и ниже

Особую трудность представляет выделение сибиреязвенных спор из почвы, так как в ней находится огромное количество различных микроорганизмов, в том числе спорообразующих сапрофитных аэробов. Существующие бактериологические методы не всегда позволяют выделить возбудителя сибирской язвы из почвы. Основная трудность состоит в отделении спор от частиц почвы. Из многих известных методов более надежным является метод предварительной подготовки пробы почвы по следующей методике:

- 1) 100 г исследуемой почвы заливают 5–10 кратным объемом стерильного фосфатного буфера или воды;
- 2) шуттелируют взвесь в течение 20–30 мин, с последующим 5–8 мин отстаиванием;
- 3) фильтруют через 2–3 слоя марли;
- 4) прогревают полученную суспензию в водяной бане в течение 30 мин при 70°C для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры;
- 5) производят посев суспензии на поверхность МПА в чашках Петри для получения изолированных колоний, а из них — чистой культуры;
- 6) полученной культурой заражают 5–10 белых мышей, подкожно в дозе 0,1–0,2 мл;
- 7) производят вскрытие павших мышей и выделение чистой культуры возбудителя сибирской язвы из органов трупа.

В настоящее время в бактериологии предложены и применяются менее трудоемкие методы, основанные на применении селективных питательных сред. В их состав включены 200–500 ЕД/мл полимиксина в сочетании с триметопримом, которые подавляют рост мезофильных, грамположительных и грамотрицательных (*B. subtilis*, *B. cereus* и *E. coli*) бактерий.

17.3. САНИТАРНО–МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ–ТИТРА И КОЛИ–ИНДЕКСА ВОДЫ

Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов. Особую опасность для здоровья человека и животных представляют патогенные бактерии, которые могут быть в воде.

Источниками загрязнения воды патогенными микроорганизмами являются выделения больных животных и людей, трупы животных, сточные воды, особенно предприятий, перерабатывающих животное сырье и др. Длительность выживания патогенных микробов в воде зависит от их вида, условий окружающей среды и может составлять от нескольких часов до нескольких лет. Так, возбудитель сибирской язвы может сохраняться в воде до 3 лет, возбудитель туберкулеза до 1 года, а бруцеллы — до 100 дней. Имеется группа болезней, для которых характерен водный путь распространения (паратифы, лептоспирозы).

Таким образом, вода может стать источником распространения инфекционных болезней, возникновения эпидемий и эпизоотий. Для санитарно-бактериологической оценки воды проводят следующие исследования.

1. Определение общего микробного числа или МАФМ в 1 мл.
2. Определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ).
3. Обнаружение в воде патогенных микроорганизмов проводят по эпидпоказаниям.

Для санитарно-микробиологического исследования пробы воды отбирают из источника в объеме не менее 500 мл. Из открытых водоемов пробу воды набирают батометром — стерильной емкостью с пробкой, в металлическом каркасе, со свинцовым грузилом. На нужной глубине пробку открывают, подтягивая ее за веревочку. Воду из рек, озер отбирают с глубины 10–15 см от поверхности, а при небольшой глубине — на расстоянии 10–15 см от дна.

Для отбора проб водопроводной воды из крана набирают 500 мл в стерильные колбы с ватной пробкой с соблюдением правил асептики. Кран предварительно стерилизуют обжиганием горящим спиртовым тампоном, затем в течение 10 мин спускают воду. Пробы воды исследуют тотчас или не позднее 2 ч с момента взятия, если это невозможно, то хранят не более 6 ч обязательно при 1–5°C в холодильнике.

17.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МАФМ В ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЕ

В чашку Петри с соблюдением правил асептики вносят 1 мл водопроводной воды без предварительного разведения, заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА (методом горячей заливки). Посевы инкубируют 24–48 ч в термостате при

30°C. После указанного срока приступают к подсчету количества колоний, выросших как на поверхности, так и в глубине агара. Учитывают только те разведения, при посеве которых на чашках вырастает от 30 до 300 колоний. При посеве воды без разведений, количество бактерий в 1 мл воды будет равно количеству выросших колоний.

При определении количества МАФАМ в воде открытых водоемов исследуемую воду предварительно разводят стерильной водой в зависимости от предполагаемого загрязнения от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-4}$, из двух последних разведений вносят по 1 мл в стерильные чашки и заливают расплавленным и охлажденным до 500°C МПА. После инкубирования при 30°C в термостате в течение 24–48 ч, подсчитывают количество колоний, умножают на степень разведения воды и определяют количество бактерий в 1 мл воды открытых водоемов. Учету подлежат чашки Петри, в которых выросло от 30 до 300 колоний. Колонии считают в каждой чашке отдельно, определяют среднеарифметическое число по двум чашкам. Полученное число колоний умножают на степень разведения исследуемой воды и получают число бактерий в 1 мл воды.

17.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА (КТ) И КОЛИ-ИНДЕКСА (КИ) ВОДЫ

Коли-титром называют наименьший объем воды, в котором обнаружена одна кишечная палочка. **Коли-индекс** показывает число кишечных палочек в 1000 мл воды.

Кишечная палочка является постоянным обитателем кишечника человека и животных, следовательно, ее присутствие в питьевой воде является индикатором фекального загрязнения. Чем выше концентрация бактерий группы кишечной палочки, тем вероятнее присутствие в исследуемой воде патогенных бактерий, таких как сальмонеллы, возбудители дизентерии и холеры. Показатели КТ и КИ указывают на санитарное состояние воды, ее пригодность в качестве питьевой. Коли-титр и коли-индекс определяют двумя методами — бродильных проб и мембранных фильтров.

При исследовании чистой воды удобнее пользоваться методом мембранных фильтров, при исследовании воды, содержащей механические частицы, затрудняющие процесс фильтрации, предпочтительнее бродильный метод.

МЕТОД БРОДИЛЬНЫХ ПРОБ

Суть этого метода заключается в посеве определенных объемов исследуемой воды в питательные среды накопления с индикатором и поплавками, инкубации ее при 37°C, с последующим пересевом из забродивших пробирок на среду Эндо, дифференциацией выросших колоний и вычислении коли-титра воды по нормативам.

Этот метод основан на ферментативной способности БГКП расщеплять при помощи ферментов лактозу или глюкозу до кислоты и газа. Исследуемая вода засеивается в различных объемах в глюкозопептонную среду с индикатором и поплавками, при наличии кишечной палочки отмечается помутнение, меняется цвет индикатора (желтый цвет переходит в красный) и появляются пузырьки газа в поплавках. Воду методом бродильных проб исследуют в три этапа.

1-й день. Засеивают водопроводную воду в объеме 333 мл (три объема по 100 мл, три — по 10 мл и три — по 1 мл). При этом вода в объемах по 100 и 10 мл засеивается в колбы и пробирки соответственно — 10 и 1 мл концентрированной ГПС, а посев воды в объеме 1 мл — в пробирки с 10 мл среды с нормальной концентрацией (готовят как концентрированную, но количество всех ингредиентов, кроме воды, уменьшают в 10 раз). Посевы исследуемой воды в средах ГПС культивируют в термостате 24 ч при 37°C.

2-й день. Учет результатов посева разных объемов воды: отсутствие помутнения, образования кислоты и газа в колбах и пробирках после посева воды свидетельствуют об отсутствии кишечной палочки в исследуемом объеме воды; наличие кишечной палочки вызывает помутнение питательной среды, происходит изменение цвета индикатора на красный и появление газа в поплавках.

Из каждого забродившего посева петлей делают пересев штрихом на агар Эндо, разделенный на сектора, в чашках Петри, таким методом, чтобы появились изолированные колонии. Посевы культивируют 24 ч при 37°C.

3-й день. Учет результатов посева на агаре Эндо: при отсутствии роста на агаре Эндо или при наличии колоний, не характерных для БГКП, дается отрицательный ответ; из колоний, характерных для бактерий БГКП (красных с металлическим оттенком), готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют.

**Определение коли-титра и коли-индекса бактерий
кишечных палочек при исследовании воды**

Количество положительных результатов анализа воды:			Коли-индекс	Коли-титр
из 3 флаконов по 100 мл	из 3 флаконов по 10 мл	из 3 флаконов по 1 мл		
1	2	3	4	5
0	0	0	<3	>333
0	0	1	3	333
0	1	0	3	333
1	0	0	4	250
1	0	1	7	143
1	1	0	7	143
1	1	1	11	91
1	2	0	11	91
2	0	0	9	111
2	0	1	14	72
2	1	0	15	67
2	1	1	20	50
2	2	0	21	48
2	2	1	28	86
3	0	0	23	43
3	0	1	39	26
3	0	2	64	16
3	1	0	43	23
3	1	1	75	13
3	1	2	120	8
3	2	0	93	11
3	2	1	150	7
3	2	2	210	5
3	3	0	240	4
3	3	1	460	2
3	3	2	1100	0,9
3	3	3	>1100	<0,9

Идентифицируют культуру по оксидазному тесту, положительную реакцию дают БГКП, которые не учитываются. Наличие в мазках грамотрицательных бактерий, с отрицательной реакцией на оксидазный тест, позволяет дать положительный ответ на присутствие БГКП в исследуемом объеме воды. Полученные результаты сравнивают с нормативами на питьевую воду (табл. 11).

Для установления свежего фекального загрязнения делают посев воды в желчно-лактозную среду с бриллиантовым зеленым. Посевы культивируют при 43°C для дифференциации кишечной палочки от хладнокровных, не растущих при такой высокой температуре. Наличие мути и газа указывает на присутствие в воде бактерий — показателей свежего фекального загрязнения.

МЕТОД МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

Суть метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема исследуемой воды на поверхности мембранных фильтров и выращивании их на поверхности агара Эндо с последующим учетом количества БГКП в 1 л воды. Метод мембранных фильтров экономичнее и позволяет дать ответ на 2-й день.

1-й день. Готовят: прибор Зейтца — протирают спиртовым тампоном, обжигают в пламени спиртовки металлические детали мембранные фильтры № 3 из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0,7 мкм, которые задерживают на своей поверхности БГКП, их кипятят 10–15 мин в дистиллированной воде, затем с соблюдением правил асептики кладут на сетку фильтрационного прибора Зейтца матовой поверхностью вверх.

В воронку прибора наливают исследуемую воду, а в приемной колбе Бунзена создают вакуум при помощи водоструйного насоса. Исследуемая вода фильтруется через мембранный фильтр, бактерии, находившиеся в ней, остаются на поверхности. После окончания фильтрации воды мембранный фильтр переносят на поверхность агара Эндо в чашках Петри. Чашки ставят в термостат при 37°C на сутки. Через поры мембранного фильтра происходит диффузия питательных компонентов среды Эндо, вследствие этого оставшиеся БГКП размножаются, и за сутки на поверхности фильтра каждая палочка образует

типичные колонии — красные с металлическим оттенком, количество которых подсчитывают.

2-й день. Учитывают наличие или отсутствие колоний на поверхности фильтров, находящихся на агаре Эндо в чашках Петри: отсутствие колоний на поверхности фильтра или наличие колоний, не характерных для БГКП, позволяет дать отрицательный ответ на присутствие кишечной палочки в исследуемом объеме воды; при наличии на фильтре красных с металлическим блеском колоний, их количество подсчитывают и из них готовят препараты, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек ставят оксидазную пробу.

Отрицательная проба на оксидазу свидетельствует о наличии в воде кишечной палочки, которая учитывается. В этом случае вычисляют коли-титр и коли-индекс исследуемой воды.

Зная показатель коли-титра, можно определить коли-индекс: для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на показатель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Например, при исследовании пробы воды профильтровано 3 объема по 100 мл. На первом фильтре выросло 3 колонии, на втором — 2, на третьем — 10, т. е. в общей сложности на трех фильтрах выросло 15 колоний.

Коли-титр этой воды составит $300 \text{ мл} : 15 = 20 \text{ мл}$, т. е. 20 мл — это наименьший объем воды, в котором находится одна кишечная палочка.

Теперь, зная коли-титр, мы определяем коли-индекс по формуле:

$$\text{Коли-индекс этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-титр}} = \frac{1000}{20} = 50;$$

$$\text{Коли-титр этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-индекс}} = \frac{1000}{50} = 20.$$

Таким образом, коли-индекс исследуемой воды равен 50, то есть в 1000 мл воды находится 50 кишечных палочек. Этой водой пользоваться нельзя, потому что коли-индекс питьевой воды должен быть не более 3.

Требования к санитарно-микробиологическому состоянию воды (СанПин) представлены в таблице 12.

Микробиологические нормативы питьевой воды

Объект контроля	Количество МАФАМ, КОЕ в 1 мл, не более	Коли-титр, не менее	Коли-индекс, не более	Периодичность контроля
Вода водопроводная	100	333	3	1 раз в месяц
Вода открытых водоемов	1000	111	9	—

Наличие в воде патогенных бактерий устанавливают путем посева на дифференциально-диагностические и элективные питательные среды с последующей их идентификацией методами, принятыми в бактериологии.

17.4. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАВОЗА

Навоз — экскременты животных, перемешанные с соломой, торфом и опилками. Состав и удобрительные свойства навоза зависят от вида животных, корма, подстилки, системы уборки и хранения.

В навозе содержится много органических соединений, поэтому он является благоприятной средой для развития различных микроорганизмов. Содержание бактерий может достигать до огромных величин, особенно при благоприятных условиях (аэрация, температура). В навозе всегда находятся микроорганизмы, принимающие участие в почвообразовательных процессах: аммонифицирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, клетчаткоразлагающие или целлюлозоразлагающие, азотфиксирующие, актиномицеты, плесневые грибы. Кроме перечисленных микроорганизмов, всегда есть представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных: кишечная палочка, энтерококки, большая группа молочнокислых бактерии, клостридий. Следовательно, с навозом в почву попадает огромное количество полезных микроорганизмов, что значительно усиливает микробиологические процессы в почве. Навоз приобретает свойства органического удобрения благодаря жизнедеятельности микробов.

Состав навоза непостоянен, он зависит от соотношения в нем твердых и жидких выделений, количества и качества корма, вида животных и других факторов. Так, конский и овечий навоз по сравнению с навозом крупного рогатого скота и свиней бывает богаче азотом, фосфором и калием. При скармливании животным концентрированных кормов получается навоз более высокого (как удобрение) качества.

Различают жидкий, полужидкий и твердый навоз — чаще с подстилочным материалом. Жидкий навоз получается при гидравлическом методе уборки помещения (влажность до 93%). Полужидкий (пастообразный) с влажностью до 85% — при содержании крупного рогатого скота и свиней без подстилки. Для получения твердого навоза животных содержат на подстилке из соломы или сфагнового торфа, влажность такого навоза 70–80%.

Предупредить потери ценных веществ в навозе и частично обезвредить его можно путем правильного хранения. Существует несколько способов хранения навоза: под скотом, плотный (анаэробный), рыхло-плотный (аэробно-анаэробный) и рыхлый (аэробный).

Хранение навоза под скотом. При таком методе хранения навоза он уплотняется, создаются анаэробные условия, вследствие чего исключаются бурные процессы жизнедеятельности бактерий — виновников потерь азота, благодаря чему в навозе сохраняется большое количество ценных веществ. Однако в воздухе помещений накапливаются аммиак и другие газы, которые раздражают слизистые оболочки животных. Неубранный навоз может быть источником бактериальных и вирусных возбудителей, т. е. создает антисанитарные условия в помещениях, поэтому их лучше очищать от навоза.

Плотное (анаэробное) хранение навоза. Навоз укладывают плотно в штабеля шириной 3–4 м, высотой до 2,0 м, произвольной длины в специально отведенных местах (навозохранилищах). Сверху навоз герметизируют слоем торфа или земли толщиной 10–15 см. При этом создаются анаэробные условия, в которых медленно развиваются микробиологические процессы (табл. 13) и происходит незначительное повышение температуры (до 25–35°C). При такой укладке навоз перепревает только через 7–8 месяцев.

**Содержание микроорганизмов
при созревании плотного навоза, млн в 1 г массы
(по данным В. Н. Былинкиной)**

Группа бактерий	Срок, прошедший с момента закладки навоза				
	Исходный материал	15 дней	1 месяц	2 месяца	4 месяца
Бактерии	940	2600	1800	140	130
Бациллы	6	15	20	7	6
Актиномицеты	1	1,6	1,8	0,9	1,5

При рыхло-плотном (аэробно-анаэробном) хранении навоз в штабеле вначале укладывают рыхлым слоем, чтобы создать аэробные условия, при которых идут энергичные микробиологические процессы, температура повышается до 50–60°C, и разогревшийся навоз уплотняется. Через несколько дней следующий слой навоза снова укладывается рыхло, и так до образования штабеля высотой 2 м. При этом азота теряется больше, чем при холодном способе.

При рыхлом (аэробном) хранении навоза создаются аэробные условия, что способствует бурному развитию микробиологических процессов. Аммонификаторы разлагают белковые вещества до аммиака, используемого аэробными нитрифицирующими бактериями, которые окисляют его до нитритов и нитратов, то есть создают пищу для денитрификаторов. При создании анаэробных условий в глубоких слоях навоза денитрификаторы восстанавливают соли азотистой и азотной кислот до молекулярного азота, который улетучивается. Благодаря деятельности последних за 3–4 мес хранения в таком навозе сохраняется 30–40% органических веществ.

Микробиологические процессы интенсивно протекают на поверхности при достаточной аэрации. В глубоких слоях перепревание навоза идет медленно. В разогретой массе температура достигает 70–80°C, что приводит к гибели и сапрофитных, и патогенных форм бактерий. При интенсивно протекающих микробиологических процессах происходят потери ценных веществ и среди них важных для растений азота и фосфора. Взаимосвязь между способами хранения, количеством микробов и потерями сухого вещества навоза видна из данных, приведенных в таблице 14.

**Потери сухого вещества навоза при разных условиях хранения
(по данным М. Степановой)**

Способы хранения	Количество микробов, млрд/1 г	Потери сухого вещества, %
Хранение в навозохранилище (с разогревом)	17,5	17,9
Хранение на открытом месте	34,2	25,5
Холодное (плотное) хранение	32,6	16,0
Хранение в неуплотненной куче	90,6	33,0

Таким образом, в зависимости от эпизоотической обстановки в хозяйстве, можно направленно вести микробиологические процессы в навозе и тем самым улучшать эпизоотическую обстановку.

Биотермическое обеззараживание навоза. Навоз, полученный от больных животных, может содержать возбудителей многих опасных болезней сельскохозяйственных животных и быть фактором передачи возбудителей инфекции и инвазии. В естественных условиях возбудители инфекционных и инвазионных заболеваний животных длительно выживают в навозе, так как он служит защитой для микробов, вирусов и яиц гельминтов от различных вредных внешних воздействий.

При заболеваниях, вызванных бактериями, не образующими споры, вирусами, а также при инвазионных болезнях навоз подвергают биотермическому обеззараживанию в навозохранилищах. Для обеззараживания навоза отводят и подготавливают специальный участок глубиной 25 см, шириной до 2,5 м и произвольной длины. Перед укладкой навоза в штабель на дно расстилают слой соломы или торфа толщиной 30–40 см, а затем на него укладывают навоз высотой до 2 м от больных животных без подстилочного материала или твердую фракцию разжиженного навоза. Уложенный в штабель навоз обкладывают со всех сторон незараженным навозом, торфом или соломой слоем 10 см, а сверху наносят такой же слой земли. В зависимости от устойчивости возбудителя обезвреживание навоза биотермическим способом проводят в течение 2–6 мес. При температуре, создаваемой

микробами (70–80°C), погибают возбудители сальмонеллеза, колибактериоза, рожи свиней, бруцеллеза, ящюра и другие возбудители.

Навоз, полученный от животных, больных и подозреваемых по заболеванию сибирской язвой, эмкарром, бешенством, паратуберкулезным энтеритом и чумой крупного рогатого скота сжигают.

Контрольные вопросы и задания

1. В чем заключается сущность исследования воздуха методом осаждения по Коху?
2. Объясните преимущество метода Кротова.
3. Какие микроорганизмы, находящиеся в воздухе, относятся к санитарно-показательным?
4. С какой целью применяется питательная среда Сабуро?
5. Перечислите правила отбора проб почвы.
6. В чем заключается суть метода серийных разведений при определении количества МАФМ?
7. В чем заключается суть определения коли-титра исследуемой почвы?
8. С какой целью добавляют в питательные среды полимиксин и триметоприм при выделении чистой культуры сибирской язвы?
9. Назовите источники загрязнения воды патогенными микроорганизмами.
10. Почему кишечная палочка отнесена к санитарно-показательным микроорганизмам?
11. В чем суть определения коли-титра воды методом бродильных проб?
12. В чем суть определения коли-титра и коли-индекса воды методом мембранных фильтров?
13. На чем основано исследование воды методом бродильных проб?
14. Перечислите методы хранения навоза.
15. На чем основано биотермическое обезвреживание навоза?
16. При каких инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных навоз подлежит сжиганию?

ГЛАВА 18. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

18.1. МИКРОФЛОРА КОЖЕВЕННО-МЕХОВОГО СЫРЬЯ

Шкура состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Внутренний слой кожи после съемки с животного называется мездряной стороной (мездрой). Парная, только что снятая с животного шкура содержит до 70% воды, белковые вещества, жиры и минеральные вещества. Таким образом, в состав парной кожи входят все вещества, необходимые для питания микроорганизмов.

На шерстом покрове кожи всегда находится множество различных микроорганизмов. Свежая мездра бывает стерильная, на ее поверхность микробы попадают во время съемки и обработки кожи. Источником микрофлоры парной кожи являются навоз, почва, вода, воздух, она загрязняется с инструментов и рук, с поверхности применяемого оборудования. На парной коже сразу после убоя обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей и дрожжи и т. д.

Состав микроорганизмов находящихся на коже, очень разнообразен: обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей, плесневые грибы, дрожжи и актиномицеты, обладающие широким набором ферментативных свойств. Начало разложения тканей можно заметить по изменению цвета, консистенции и гнилостному запаху.

Гнилостное разложение протекает в три стадии. Первая характеризуется быстрым размножением бактерий в подкожной клетчатке с последующим проникновением их в слой эпидермиса и волосяные сумки. Видимых изменений нет. Во второй

стадии микробы проникают вглубь шкуры, при этом мездра ослизняется и темнеет, волос легко выпадает. В третьей стадии ткань дермы разлагается, становится ослизлой и дряблой, эпидермис легко отслаивается. Шкура теряет прочность, легко рывается и издает сильный гнилостный запах (сероводорода, аммиака).

В начале гнилостного процесса на поверхности шкуры преобладают аэробные аммонификаторы (*Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium* и др.), а по мере продвижения в толщу шкуры можно обнаружить анаэробы *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenum*.

Плесневение шкур происходит при хранении их в сырых прохладных помещениях. На поверхности влажной мездры появляются пигментированные колонии плесневых грибов, которые быстро заражают все сырье. Протеолитические ферменты психрофильных бактерий и плесневых грибов разрушают мездру, в результате чего снижается товарная ценность сырья.

18.2. КОНСЕРВИРОВАНИЕ КОЖЕВЕННОГО СЫРЬЯ

Шкуры, поступающие на промышленную переработку, должны сохранять первоначальную структуру. Такими они остаются только в том случае, если сразу после охлаждения, не позднее чем через 3–4 ч после съема, их консервируют. Существует много способов консервирования и все они направлены на то, чтобы предотвратить развитие микробов.

Соление — самый распространенный способ консервирования кожевенного сырья. Хлорид натрия повышает осмотическое давление и создает неблагоприятные условия для развития микробов. Соление может быть мокрым и соленым.

Мокросоленое консервирование проводят путем засолки шкур в расстил или комбинированно с предварительным тузлукованием. При солении в расстил на стеллаже с приподнятым центром шкуру расстилают мездрой вверх. Затем ее обильно посыпают солью и натирают, далее на первую шкуру расстилают вторую, которую натирают солью и так до образования штабеля высотой 1–1,5 м. Шкуры в таком штабеле выдерживают 5–7 дней.

Тузлукование характеризуется тем, что вначале шкуры пропитывают крепким раствором поваренной соли, а затем подсаживают и выдерживают в штабелях. Тузлукуют хорошо промытые парные или размороженные шкуры, которые загружают в чан с 25,6% раствором хлорида натрия мездрой вверх. Шкуры выдерживают в чане от 10 до 20 ч в зависимости от их размеров, после этого их извлекают, оставляют на 2 ч и солят в расстил. Тузлучный раствор используют не более 5 раз, для увеличения антимикробных свойств в него добавляют кремнистофтористый натрий из расчета 0,75 г на 1 л.

Сухосоленое консервирование чаще применяется в южных регионах и на отгонных пастбищах. Свежие шкуры солят, складывают в штабеля и выдерживают трое суток, затем сушат мездрой вверх.

Пресно-сухое консервирование применяют для обработки мелких шкур. Сушку проводят обязательно под навесом или в специальных сушилках. Сушка на солнце вызывает ороговение. В процессе сушки происходит обезвоживание шкуры, влажность снижается до 15%, что приостанавливает жизнедеятельность микробов.

Замораживание. Низкая температура подавляет жизнедеятельность микробов, ферментативные процессы и тем самым сохраняет парную шкуру. Резкое колебание температуры, повторное замораживание и оттаивание приводят к быстрой порче сырья. В результате появляются пороки, снижающие товарную ценность шкур.

18.3. МИКРОФЛОРА ШЕРСТИ

На поверхности шерсти имеется большое количество бактерий, попавших из почвы, навоза. Наиболее активными разрушителями шерсти являются *Bac. mesentericus*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, из микроскопических грибов — аспергиллы и пенициллы, которые вызывают процесс аммонификации кератина, что приводит к разрушению волокна. Степень изменения шерсти зависит не только от вида микробов, но и от других факторов, таких как температура и влажность окружающей среды. Сырая шерсть под действием термофильных бактерий теряет блеск, цвет, эластичность, а при активной аэрации

нагревается и даже воспламеняется. В прелой шерсти уменьшается прочность волокон, а под действием *Pseudomonas* происходит изменение цвета шерсти. Для предотвращения развития микробиологических процессов и порчи шерсти, ее надо хранить в тюках, на деревянных брусках, в сухих и хорошо проветриваемых помещениях.

18.4. КОЖЕВЕННО–МЕХОВОЕ СЫРЬЕ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИСТОЧНИК ИНФЕКЦИИ

Кожевенно-меховое сырье, полученное от больных животных, может служить источником возбудителей инфекционных болезней. При контакте человека с таким сырьем происходит его заражение. Особенно опасно сырье, обсемененное спорообразующими возбудителями, которые длительное время сохраняются во внешней среде. Шкуры от вынужденно убитых животных должны быть проверены на сибирскую язву при помощи реакции преципитации (Асколи). Сырье от больных животных тщательно дезинфицируют или уничтожают, если есть подозрение на наличие возбудителя сибирской язвы, эмфизематозного карбункула или других особо опасных возбудителей.

Для предотвращения распространения возбудителей через кожевенно-меховое сырье необходимо соблюдать ветеринарно-санитарные правила на складах и предприятиях по его обработке.

Контрольные вопросы и задания

1. Перечислите виды микроорганизмов, принимающих участие в микробном разложении кожевенного сырья.
2. На чем основаны методы консервирования кожевенного сырья?
3. Назовите источники микробного загрязнения кожевенно-мехового сырья.

ГЛАВА 19. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

19.1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ПРОМЫСЛОВЫХ ЖИВОТНЫХ

Бактериологическое исследование мяса и мясных продуктов проводят в соответствии с ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа» и другими нормативными документами, утвержденными Госэпиднадзором и Департаментом ветеринарии МСХ РФ.

Мышцы здоровых животных и птиц не содержат микроорганизмы. Загрязнение мяса микробами начинается в момент убоя. Кровь, вытекающая из артерий, отчасти засасывается вновь через вены, зияющие в ране и имеющие отрицательное давление. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. Особенно обильно загрязняется мясо, если при обработке туши повреждают кишечник.

Дальнейшее загрязнение поверхности мяса происходит при его транспортировке, при нарушении норм и правил хранения. Попавшие в мясо микроорганизмы при благоприятной температуре могут размножаться, поскольку данный продукт является хорошей питательной средой, а количество их на 1 см² поверхности мяса может достигать многих миллионов.

Гарантией доброкачественности и эпидемической безопасности мяса и мясных продуктов на этапе их продвижения от предприятия к потребителю являются ветеринарный и санитарно-микробиологический контроль.

Бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов проводят во всех случаях, предусмотренных правилами ветеринарно-санитарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов, а именно:

- при вынужденном убое животных, независимо от причин убоя;
- при желудочно-кишечных болезнях, тяжело протекающих заболеваниях органов дыхания;
- когда предполагают обсеменение возбудителями зооантропонозов или пищевых токсикоинфекций и токсикозов;
- при удалении кишечника из туши позже двух часов после убоя животного.

На бактериологическое исследование должно быть направлено мясо, если невозможно определить пригодность его в пищу по результатам органолептического исследования, по ряду физико-химических показателей, при наличии обильного микробного обсеменения мяса установленного в результате микроскопии мазков-отпечатков. Итак, данное исследование проводится при сомнении в отношении пригодности мяса и невозможности ее определить путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Чаще всего на поверхности мясных туш находятся стафилококки и микрококки, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек, различные виды гнилостных аэробных бацилл и анаэробных клостридий, дрожжи и споры плесневых грибов.

Отбор проб. В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патолого-анатомических изменений в микробиологический отдел от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и внутренних органов.

Каждую пробу заворачивают отдельно, помещают в общую упаковку, на которой ставят дату отбора образцов, номер туши. Тару с образцами опечатывают. В сопроводительном документе указывают: вид и количество мяса, номера образцов, адрес хозяйства, причину исследования, дату и подпись направившего. Пробы охлажденных продуктов транспортируют при температуре от 0 до 2°C.

Пробы мяса, предназначенные для микробиологического анализа, исследуют непосредственно после поступления их в лабораторию.

Микробиологический контроль мяса и мясопродуктов проводят для определения количества МАФАМ, бактерий группы кишечных палочек, возбудителей зооантропонозов; обнаружения сальмонелл, палочки протей, токсичных стафилококков и патогенных анаэробов; в случае сомнений в отношении

пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Исследование мяса состоит из следующих этапов.

1. Органолептическая оценка мяса.
2. Микроскопическое исследование препаратов, приготовленных из мяса, окрашенных по Граму, на капсулы и споры.
3. Первичный посев на МПА, МПБ, селективные и специальные среды, среды обогащения.
4. Идентификация выделенных культур по морфологическим, культурально-биохимическим и антигенным свойствам.
5. Заражение лабораторных животных в необходимых случаях.

Продолжительность бактериологического исследования мяса — 3 сут, при постановке биопробы — до 10 сут. Исследуемые туши после взятия проб помещают в холодильник-изолятор при температуре 0–4°C.

Органолептическая оценка мяса. Доброкачественное мясо при подсыхании образует корочку бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает. Несвежее мясо покрыто плотной, темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании ямка восстанавливается не сразу. Поверхность испорченного мяса ослизненная, консистенция дряблая, мажущаяся; жир слизистый с прогорклым запахом — такое мясо бракуют.

Для *микроскопического исследования мяса* из каждой пробы готовят препараты-отпечатки для окрашивания по Граму, на наличие капсул — по Ольту или Михину. В каждом препарате изучают не менее 25 полей зрения.

Таблица 15

Оценка свежести мяса микроскопическим методом

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели
Свежее	5,8–6,2	Единичные кокки или палочки, на стекле нет остатков ткани
Сомнительной свежести	6,3–6,5	До 20–30 кокков, единичные палочки, на стекле следы распада мышечной ткани
Несвежее, непригодное в пищу	6,7 и выше	Множество палочек, на стекле распавшаяся мышечная ткань

Для приготовления препарата-отпечатка стерильными ножницами вырезают из середины каждого образца кусочек размером 1,5×2×2,5 см и прикладывают к предметному стеклу свежим срезом. Делают по 3 отпечатка на 2–3 предметных стеклах. Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.

Мазки можно фиксировать физическим или химическим методом. При химическом методе фиксации препараты погружают в метанол на 5 мин или на 15 мин в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира), окрашивают по Граму и подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, учитывая отдельно шаровидные и палочковидные (табл. 15).

Мясо считается свежим, если в мазках-отпечатках не обнаружена микрофлора или в поле зрения препарата видны единичные (до 10 клеток) кокки и палочковидные бактерии и нет следов распада мышечной ткани.

Препарат-отпечаток из мяса сомнительной свежести окрашивается удовлетворительно, видны следы распада мышечной ткани, ядра мышечных волокон в состоянии распада. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается не более 30 кокков или палочек.

Препарат-отпечаток из мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. В поле зрения в препаратах как из поверхностных, так и из глубинных слоев преобладают палочки. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют, все поле зрения состоит из палочек. Среди них могут быть кишечные палочки, флуоресцирующие бактерии, спорообразующие бактерии. Из аэробных спорообразующих бактерий — *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*; из факультативно-анаэробных — *Proteus vulgaris*, из анаэробных — *Cl. putrificus*, *Cl. sporogenes*.

При физическом методе используется пламя спиртовки.

19.2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА ПТИЦ

Подготовку проб к исследованию проводят общепринятыми методами по ГОСТ 26668-85, ГОСТ 26669-85, дополнениями по ГОСТ Р 50396.0-92. Количество МАФМ определяют в соответствии с ГОСТ Р 50396.1-92 и ГОСТ 7702.2.1-95.

Для анализа мяса здоровой птицы от партии отбирают не менее трех тушек. Каждую тушку в отдельности упаковывают в полиэтиленовую пленку или пергаментную бумагу, опечатывают и составляют акт с указанием наименования предприятия, вида птицы, размера партии и других данных. С момента отбора и до начала исследования образцы хранят при температуре 0–2°C не более 24 ч.

Отбор проб от каждой тушки проводят одним из трех методов:

- вырезание кусочков мышц из различных участков;
- смыв со всей поверхности тушки смывной стерильной водой;
- смыв с поверхности тушки тампоном.

Метод вырезания кусочков мышц используют для выявления сальмонелл, а также для определения других микробиологических показателей тушки. Из области грудной части, голени и бедра вырезают на всю глубину мышцы в равных количествах. Масса отобранной пробы должна быть 100–150 г. Всю пробу измельчают ножницами с соблюдением правил асептики, растирают в фарфоровой ступке пестиком, перемешивают и получают объединенную пробу одной тушки или полутушки. Затем 25 г продукта используют для исследования на сальмонеллы, а 10 г — для приготовления серии десятикратных разведений с целью определения МАФАМ.

Для оценки санитарного состояния производства используют метод смыва со всей поверхности тушки смывной стерильной водой и метод смыва тампоном. В смывах определяют МАФАМ, споры клостридий и бацилл, а также другие микроорганизмы по показаниям производства (наличие сальмонелл в смывах не определяют).

Отбор проб методом смыва со всей тушки проводят следующим образом: тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов, наливают стерильную воду в количестве, равном массе тушки (т. е. 1500 мл), встряхивают содержимое пакета в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений.

Отбор проб методом смыва стерильным тампоном применим к потрошенным тушкам любой массы. Смыв осуществляют с разных участков. С тушек крупной птицы общая площадь смывной поверхности должна составлять 100 см² (по трафарету),

смыв проводят 2–5 тампонами, которые помещают в колбу со 100 мл стерильной жидкости и встряхивают в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом для приготовления последовательных десятикратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см² поверхности тушки.

Отбор проб потрохов и бескостного кускового мяса проводят следующим методом: от партии продукта каждого наименования отбирают точечные пробы (по 10–50 г), среднюю пробу массой не менее 150 г помещают в стерильную посуду. Измельчают, тщательно перемешивают и взвешивают навеску 25 г для посева на сальмонеллы и 10 г для приготовления десятикратных разведений (для приготовления первого разведения к 10 г измельченной массы добавляют 90 мл стерильной воды).

При микробиологическом исследовании мышечных желудков и кускового мяса, кроме выделения сальмонелл, рекомендуется отбор проб методом смыва в полимерном пакете. Для этого среднюю пробу продукта одного наименования массой не менее 150 г помещают в новый пакет, взвешивают и добавляют стерильную смывную воду в количестве равном массе пробы. Встряхивают 2 мин и 1 мл смывной жидкости используют для серии последовательных десятикратных разведений.

Расчет количества микроорганизмов определяют в 1 г продукта или в 1 мл смывной жидкости по массе равной массе пробы продукта.

Для выделения микроорганизмов из мяса птицы, субпродуктов и полуфабрикатов используют верхний слой надосадочной жидкости, а для определения их количества — взвесь исходного разведения.

Микробиологический анализ проводят на наличие МАФАМ, БГКП, сальмонелл, сульфитредуцирующих клостридий (СРК), протей, золотистого стафилококка, микробиологические показатели по которым для птицеводческой продукции регламентированы СанПиН.

Методика определения количества МАФАМ методом смыва со всей тушки: тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов, наливают стерильную воду в количестве равном массе тушки (т. е. 1500 мл), встряхивают содержимое пакета в течение 2 мин. Полученная

смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений по общепринятой методике, для определения количества МАФАМ в 1 мл смыва. Из соответствующих разведений делают посев по 1 мл одновременно в две чашки Петри, заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА с глюкозой. Питательную среду тщательно размешивают круговыми движениями чашки по поверхности стола для равномерного распределения посевного материала и получения изолированных колоний. Чашки с посевами ставят в термостат вверх дном, чтобы предотвратить размывание выросших колоний конденсатом, образующимся на внутренней поверхности крышки; выдерживают в термостате при 30°C в течение 72 ч.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. При этом подсчитывают все выросшие колонии, учитывают чашки, в которых количество колоний составляет 30–300. По результатам подсчета вычисляют среднее арифметическое значение количества колоний из всех посевов одного разведения.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта или 1 мл смывной жидкости определяют по формуле

$$x = a \cdot 10^n \frac{m + V}{m \cdot V},$$

где a — среднее арифметическое количество колоний в посевах; n — число 10-кратных разведений навески продукта; m — масса (объем) навески продукта (смыва), взятая для приготовления исходного разведения (г или мл); V — объем жидкости, взятый для приготовления исходного разведения навески продукта (смыва), г или мл.

Количество микроорганизмов на 1 см² поверхности продукта определяют по формуле

$$x_1 = a \cdot 10^n \frac{V}{S \cdot V_1},$$

где S — общая площадь анализируемой поверхности в см²; V_1 — объем инокулята, внесенного в чашку Петри, мл.

Результаты вычисления количества микроорганизмов в 1 г продукта (в 1 мл смыва с продукта смывной жидкостью или на 1 см² поверхности продукта при смыве тампоном) выражают

числом колониеобразующих единиц (КОЕ) от 1,0 до 9,9, умноженным на 10^n степень разведения.

При показателе МАФАМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и при отсутствии признаков органолептической порчи перечисленные выше продукты не подлежат хранению в охлажденном состоянии. Их срочно отправляют на изготовление термически обработанных продуктов или на заморозку. Реализация их в охлажденном состоянии возможна в течение 4–6 ч.

Партию продукта с показателем МАФАМ более $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и признаками органолептической порчи направляют на утилизацию. В соответствии с Санитарными правилами и нормами количество МАФАМ в 1 г охлажденного и замороженного мяса птицы не должно превышать 100 000 КОЕ/г.

19.3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ И СЫРЬЯ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КОЛБАС, ФАРША И ДРУГИХ ВИДОВ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Консервы — пищевые продукты, предназначенные для длительного хранения, специально обработанные и герметично упакованные в тару, которая защищает их от проникновения микроорганизмов во время хранения и транспортировки.

Основным сырьем для выработки мясных баночных консервов служит мясо животных и субпродукты, которые всегда в той или иной степени обсеменены различными сапрофитными микробами, в том числе возбудителями порчи консервов (анаэробными клостридиями и термофильными бациллами), а иногда и токсигенными и патогенными микроорганизмами (токсигенные стафилококки, сальмонеллы и др.). Для выработки мясных консервов можно использовать мясо и субпродукты только от здоровых и упитанных животных. Нельзя применять сырье плохо обескровленное, загрязненное, дважды замороженное, условно годное. Степень обсеменения подготавливаемого сырья микроорганизмами находится в прямой зависимости от санитарно-гигиенических условий производства. При этом источниками обсеменения могут быть руки рабочих или оборудование,

а также вспомогательные материалы (пряности, соль, сахар, жир-сырец), которые всегда содержат микроорганизмы.

Стерилизация консервов — заключительный этап технологического процесса консервирования. Под стерилизацией подразумевается различная степень нагревания продукта, приводящая к получению микробиологически стабильного консервированного продукта, не содержащего микроорганизмы, способные развиваться в нем при хранении в определенных температурных условиях. Основная цель стерилизации консервов — уничтожение патогенных и токсигенных микроорганизмов, способных вызывать порчу продукта. Режим стерилизации устанавливается в зависимости от вида консервов, для мясных консервов это 112–120°C. Однако, несмотря на воздействие высоких температур, в консервах могут сохраняться жизнеспособные микробные клетки, то есть не всегда достигается полная стерилизация всех банок.

Эффективность стерилизации консервов зависит не только от продолжительности и температуры нагревания, но и от количественного состава микрофлоры, рН среды, содержания жира, поваренной соли и сахара.

Споры различных видов спорообразующих микроорганизмов обладают неодинаковой устойчивостью к высоким температурам. Так, споры многих мезофильных аэробных бацилл гибнут уже при 100°C, тогда как споры *Bac. subtilis* могут сохранять жизнеспособность при 130°C. Споры анаэробных микроорганизмов погибают при высоких температурах медленнее, чем споры аэробов.

В большой степени на результаты стерилизации влияет количественный состав микрофлоры: чем выше начальная микробная обсемененность консервов, тем больше времени требуется для полного уничтожения микроорганизмов и тем больше их может выжить при нагревании. Кислая среда ускоряет коагуляцию белков и отмирание микроорганизмов, а также вызывает снижение термоустойчивости вегетативных клеток и их спор.

Микроорганизмы, которые в процессе стерилизации консервов сохранили свою жизнеспособность, принято называть остаточной микрофлорой. Состав остаточной микрофлоры стерилизованных консервов, как правило, представлен споровыми микроорганизмами. Наличие в готовых консервах жизнеспособных клеток бесспорных бактерий всегда указывает на

нарушение температурного режима, в результате которого стерилизация оказалась недостаточной. В таких случаях кроме спорообразующих микробов в консервах обнаруживают стафилококки, кишечную палочку и протей.

В соответствии с положением о порядке санитарно-технического контроля на производственных предприятиях, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания все консервы в зависимости от состава сырья, термической обработки и величины рН подразделяют на 6 групп (А, Б, В, Г, Д, Е). Группы Б, В, Г, Е — это растительные консервы (овощи, фрукты, плодово-ягодные компоты, соки).

Группа А — полные консервы: консервы из говядины, свинины, конины, мяса птицы с растительными наполнителями или без них, простерилизованные в автоклавах при 110–120°C, со сроком хранения от 9 мес. до 2 лет при температуре не выше 30°C.

Группа Д — полуконсервы (ветчина, бекон, сосиски) стерилизованные при 100–110°C. Их безопасность и сохранность гарантируются при хранении при температуре от 2 до 15°C.

Особая группа консервов — пресервы (пастеризованные консервы) производят из говядины, свинины, мяса птицы, рыбы, которые подвергают тепловой обработке при температуре не выше 100°C, а в случае асептического консервирования — при 130°C. Сохранность таких консервов гарантируется хранением при температуре не выше 5°C.

Правила отбора проб. Из каждой консервной банки отбирают одну или несколько навесок, предназначенных для непосредственного высева и приготовления последовательных разведений для проведения всех видов исследования — весовым или объемным методом. После вскрытия банки консервов в условиях, исключающих микробное загрязнение, в образце должны быть представлены все компоненты и в том же соотношении, что и в продукте.

Стерильность консервов определяют в случаях, когда они выработаны по специальным заказам и для поставок экспедициям, космонавтике и лечебным учреждениям.

Под стерильностью консервов (см. табл. 16) понимают отсутствие жизнеспособных микроорганизмов в консервированном продукте.

При определении стерильности консервов 1 мл (г) исходного продукта без разведения вносят в чашку Петри, заливают расплав-

Микробиологические нормативы мясных консервов

Группа продуктов	МА-ФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие			
		БГКП	СРК	<i>S. aureus</i>	патогенных МО, в том числе сальмонелл
Консервы пастеризованные из говядины и свинины	2×10^2	1	0,1	1	25
Консервы стерилизованные из говядины и свинины	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности для консервов группы А				

ленным и охлажденным до 50°C МПА, тщательно перемешивают содержимое чашки, охлаждают и ставят в термостат при 37°C. Через 72 ч подсчитывают количество выросших колоний и определяют количество микроорганизмов в 1 см³ или в 1 г продукта.

19.4. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ И ПРОДУКТОВ ИЗ МЯСА

При бактериологическом исследовании колбасных изделий и продуктов из мяса отбирают пробы в соответствии с ГОСТ 9792-73, ГОСТ Р51447-99, ГОСТ 26668-85.

Колбасные изделия — продукты переработки мяса, которые употребляют в пищу без дополнительной подготовки, так как мясо, используемое для приготовления, подвергают специальной механической, физико-химической и термической обработке. К этим изделиям относятся фаршированные, вареные, полукопченые, варено-копченые, сырокопченые, ливерные и кровяные колбасы, мясные хлебцы, сосиски, сардельки, студни.

Колбасные изделия представляют собой благоприятную среду для развития различных микроорганизмов, вызывающих микробную порчу: термофильных молочнокислых бактерий (закисание), плесневых грибов и протеолитических бацилл (гниение). Быстро портятся варено-копченые и вареные колбасные изделия влажностью более 40–50%, особенно при нарушениях температурно-влажностного режима хранения. В меньшей сте-

**Микробиологические нормативы
колбасных изделий и продуктов из мяса животных и птиц**

Группа продуктов	МАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие			
		БГКП	СРК	<i>S. aureus</i>	патогенных МО, в том числе сальмонелл
Колбаса сырокопченая	—	0,1	0,01	1	25
Вареные колбасные изделия, сардельки, сосиски:					
высшего и I сорта	$1 \cdot 10^3$	1	00,01	1	25
II сорта	$2,5 \cdot 10^3$	1	0,01	1	25

пени подвержены порче сырокопченые изделия из-за низкого содержания влаги (20–30%).

Степень исходной микробной обсемененности колбасного фарша (табл. 17) зависит от санитарно-гигиенических условий производства и соблюдения технологических режимов.

В процессе приготовления колбасных изделий мясной фарш обсеменяется различными микроорганизмами, попадающими в него из молочных, яичных, мучных продуктов, белковых стабилизаторов, посолочных смесей (соль, сахар, нитраты), пряностей и других компонентов.

Бактериологическое исследование колбасных изделий направлено на определение количества МАФАМ, БГКП, индикацию сальмонелл, бактерий родов *Proteus*, микроорганизмов порчи — в основном это дрожжи и плесневые грибы.

19.5. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЯИЦ И ЯИЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Санитарно-микробиологическому контролю подвергают поступающее сырье (яйца куриные), готовые продукты: яичный меланж, яичный порошок. Также производится контроль соблюдения технологических и санитарно-гигиенических режимов производства яйцепродуктов.

Яйца для микробиологического анализа отбирают из разных мест партии методом случайной выборки в количестве 30 шт. (в некоторых случаях — не менее 5–10 яиц). Отобранную пробу упаковывают в чистую тару и транспортируют в условиях, исключающих повреждение и вторичную контаминацию (загрязнение).

Особенность санитарно-микробиологического исследования яиц и продуктов их переработки заключается в одновременном исследовании микрофлоры на поверхности скорлупы и в содержимом яйца.

При микробиологическом исследовании поверхности скорлупы яиц делают смывы, полученные тремя методами.

При получении смыва **методом тампона** в ступку, содержащую 10 мл стерильного физраствора, погружают яйцо и с помощью стерильного тампона обмывают поверхность яйца в течение 2–3 мин, полученный смыв исследуют.

При получении смыва **методом ополаскивания** в стерильную посуду или полиэтиленовый пакет наливают 10 мл стерильной жидкости, в которую погружают яйцо и встряхивают 5 мин. Полученный смыв исследуют.

При получении смыва **методом измельчения** скорлупу и подскорлупную оболочку от трех яиц отделяют от содержимого и помещают в стерильные ступки. Содержимое растирают пестиком, заливают 90 мл стерильной жидкости. После 3–5 мин отстаивания надосадочную жидкость исследуют без разведения или готовят десятикратные разведения в зависимости от степени загрязнения поверхности скорлупы.

Математически поверхность яйца вычисляют по формуле

$$S = 3,14 \frac{B \cdot P}{2},$$

где S — площадь поверхности; B — ширина яйца, см; P — длина окружности, см.

Общую бактериальную обсемененность поверхности яиц (т. е. количество МАФАМ), определяют общепринятыми методами путем посева 1 мл смыва или его десятикратных разведений параллельно в 2 чашки Петри, которые заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА, культивируют при 30°C в термостате 48–72 ч. Подсчитывают все колонии, вырос-

шие в глубине и на поверхности плотной питательной среды, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц. В результате получают количество микроорганизмов (КОЕ/см²) на 1 см² скорлупы яиц.

Перед микробиологическим исследованием содержимого яиц поверхность скорлупы обмывают теплым 0,2% -м раствором каустической соды или 0,5% -м раствором кальцинированной соды в течение 2 мин. После мойки яйцо ополаскивают водопроводной водой, дают стечь и погружают в 70% -й спирт на 10 мин, после чего обжигают в пламени.

На остром конце яйца делают отверстие диаметром около 1 см и снова обжигают, содержимое одного или нескольких яиц выливают в колбу и гомогенизируют с помощью бус или пипеток до однородной консистенции. Исследование проводят сразу, для этого 10 мл яичной массы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильного физраствора, — это исходное разведение 1:10, из которого переносят 1 мл в пробирку с 9 мл физраствора, получая разведение 1:10, 1:100 и т. д. до нужного конечного разведения.

Микробиологическое исследование содержимого яиц сводится к определению МАФАМ, выявлению БГКП, золотистого стафилококка, протей, сальмонелл, в некоторых случаях *B. cereus*.

При микробиологическом исследовании яичных мороженных продуктов (меланжа, белка, желтка) для проверки соответствия качества требованиям действующей нормативно-технической документации из разных мест партии отбирают 3% ящичков, но не менее 6. Из общего количества отобранных ящичков отбирают по одному пакету, банке, из каждого отобранного в выборку ящичка. Из разных мест каждого пакета, банки стерильным масляным щупом отбирают не менее 4 столбиков продукта в стерильную посуду. Перед проведением микробиологического исследования пробы размораживают в водяной бане при температуре не выше 45°C до температуры внутри продукта не выше 1–5°C.

Отобранные пробы соединяют, тщательно перемешивают и получают объединенную пробу массой не более 0,5 кг, которую помещают в стерильную посуду с притертой пробкой. Из объединенной пробы отбирают 100 г продукта для проведения

микробиологического анализа, остальную часть используют для проведения органолептических и физико-химических методов анализа.

Для оценки санитарно-микробиологического качества яичных сухих продуктов из разных мест исследуемой партии отбирают 3% единиц упаковки, но не менее 3 единиц. Из разных мест отобранной в выборку упаковочной единицы отбирают не менее 3 точечных проб, взятых в равном количестве.

Отбор проб осуществляют щупом, черпаком, ложкой, металлической трубкой, шпателем или другим приспособлением, которое каждый раз перед использованием стерилизуют фламбированием или заранее в автоклаве.

Масса пробы, отобранной из каждой бочки, мешка, ящика или банки должна быть 200 г.

От партии сухого яичного продукта, фасованного в пакеты, отбирают из разных мест каждого отобранного в выборку ящика по 3 пакета. Пробы соединяют, тщательно перемешивают, подвергают квартованию и получают объединенную пробу массой 0,5 кг.

Объединенную пробу яичного порошка делят на 2 равные части, которые помещают в чистые стерильные стеклянные банки с притертыми пробками или полиэтиленовые пакеты. Одну часть пробы направляют в лабораторию для исследования, другую пломбируют, снабжают этикеткой и хранят один месяц при температуре не выше 20°C и относительной влажности 65–75% на случай разногласий при определении качества сухого яичного продукта. На этикетке указывают:

- наименование предприятия-изготовителя;
- наименование продукта;
- дату выработки;
- номер партии;
- дату и место отбора проб;
- фамилии лиц, отобравших пробу.

Из объединенной пробы в стерильную посуду отбирают 100 г сухого яичного продукта для проведения анализа, остальное количество используют для проведения органолептических и физико-химических анализов.

Для приготовления разведений навеску сухих яичных продуктов массой 10 г вносят в колбочку с 90 мл стерильного физ-

**Нормативы микробиологических показателей
яиц и яичных продуктов**

Продукт	МАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г.), в которой не допускается наличие			
		БГКП	<i>S. aureus</i>	<i>Proteus</i> <i>fr. vulgaris</i>	<i>Salmonella</i>
Яйцо куриное, перепелиное, диетическое	5·10 ³	0,1	—	—	25
Яйцо куриное, столовое	5·10 ⁵	0,01	—	—	25
Меланж яичный, мороженый	5·10 ⁵	0,1	1	1	25

раствора, соблюдая правила асептики, и готовят серию десятикратных разведений яичных продуктов в зависимости от предполагаемого обсеменения продукта.

При несоответствии качества яиц и яйцепродуктов по микробиологическим показателям (табл. 18) их направляют на выработку термически обрабатываемых продуктов.

19.6. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

Сорт молока зависит от количества МАФАМ в 1 мл молока, по Сан ПиН 2.3.2.1078-01 г сырое молоко подразделяют на:

- высший сорт — не более 300 000 бактерий в 1 мл;
- I сорт — не более 500 000 бактерий в 1 мл;
- II сорт — не более 4 000 000 в 1 мл.

Для определения количества бактерий в молоке проводят бактериологическое исследование по следующей методике: 1 мл сырого молока вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, получается первое разведение 1:10 (10^{-1}), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды — получается разведение 1:100 (10^{-2}) и так далее до разведения 1:10⁻⁶, т. е. до миллиона. Из двух последних разведений (10^{-5} и 10^{-6}) по 1 мл вносят в две чашки Петри, каждую заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА, перемешивают путем легкого вращения

Показатели сорта молока

Показатели	Норма для сорта		
	высший, I	II	несортное
Кислотность, °Т	16–18	16–20	Не более 21
Степень чистоты по эталону	1	2	3
Бактериальная обсемененность по редуцтазной пробе	1	2	3
Температура	Ниже 10°С	Ниже 10°С	Ниже 10°С

тельного покачивания и после застывания агара помещают в термостат при температуре 37°С на 24–48 ч. После этого подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметическое число. При этом для подсчета берут те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 500.

Число колоний, выросших в каждой чашке, переводят на 1 мл или 1 г продукта с учетом разведения и определяют количество бактерий в 1 мл исследуемого молока. Следовательно, бактериологическим методом сорт молока можно установить лишь через сутки после приема молока на молочном заводе. Никакое производство не может себе этого позволить. Поэтому на молочном заводе сорт молока определяют быстро, косвенным путем: при приеме учитывают комплекс признаков (табл. 19): кислотность, редуцтазную пробу и степень чистоты по эталону.

На все показатели, по которым производится контроль качества принимаемого молока, следует обращать самое серьезное внимание, так как оценка молока при сдаче осуществляется по худшему из них. Так, если по редуцтазной пробе оно относится к 1-му классу, по степени чистоты — к 1-й группе, а кислотность повышена, например, до 20°Т, то молоко будет отнесено ко II сорту.

19.6.1. КИСЛОТНОСТЬ МОЛОКА

Это один из основных показателей санитарного качества молока, по которому при приеме осуществляется сортировка. Кислотность молока прямо связана с бактериальной обсемененностью. Свежее молоко имеет нейтральную реакцию и почти не содержит в своем составе молочной кислоты.

Кислотность молока обозначают в условных градусах Тернера (°Т). Под условными градусами понимают количество миллилитров 0,1 М раствора натра (калия) едкого, необходимых для нейтрализации 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой в присутствии индикатора фенолфталеина.

Показатель титруемой кислотности позволяет установить повышение кислотности в результате размножения молочнокислых бактерий, сбраживающих лактозу до молочной кислоты. Чем дольше хранится молоко в неохлажденном состоянии при температуре выше +10°С, тем больше в нем накапливается молочной кислоты, тем выше его кислотность. Нормальная кислотность свежего молока колеблется от 16 до 18°Т. При кислотности выше 21°Т отмечается 1-я степень порчи молока — прокисание. Такое молоко не выдерживает тепловой обработки и не может быть сырьем для выработки стандартных молочных продуктов.

19.6.2. СТЕПЕНЬ ЧИСТОТЫ

Показателем санитарных условий получения молока является определение степени чистоты, которая характеризуется наличием механических примесей.

Методика: через специальный фильтр пропускают 250 мл молока и сравнивают полученный осадок на фильтре с эталонами. Молоко по степени загрязненности делят на группы: 1 — на фильтре нет частиц механической примеси; 2 — на фильтре отдельные частицы механической примеси; 3 — на фильтре заметный осадок (волоски, частицы сена, песка).

19.6.3. ПРОБА НА РЕДУКТАЗУ

Этот косвенный метод определения общей микробной обсемененности основан на изменении биохимических показателей молока. Преимущество — простота и быстрота проведения анализа по сравнению с бактериологическим исследованием.

Суть этого метода заключается в том, что микроорганизмы, попавшие в молоко, в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду, наряду с другими окислительно-восстановительными ферментами, анаэробные дегидразы, которые по старой классификации называются редуктазами. Существует

зависимость между общим количеством бактерий в молоке и содержанием в нем редуктазы, что позволяет использовать редуктазную пробу как косвенный показатель степени бактериальной обсемененности сырого молока. Фермент редуктаза обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, которая при этом наглядно обесцвечивается.

Методика: в пробирки наливают 20 мл исследуемого молока и 1 мл рабочего раствора метиленовой сини, закрывают резиновой пробкой, смешивают путем трехкратного переворачивания пробирки (молоко при этом окрашивается в синий цвет). Пробирки помещают в водяную баню при 40°C (на лабораторных занятиях можно внести изменения: наливать 10 мл исследуемого молока и добавлять 0,5 мл метиленовой сини).

Наблюдение за изменением окраски ведут через 20 мин, 2 ч, 5 ч 30 мин после начала анализа. В чистом свежем молоке фермента редуктазы содержится очень мало, поэтому оно обесцвечивается медленно.

В зависимости от времени обесцвечивания метиленовой сини молоко относится к одному из четырех классов в соответствии с ГОСТ. Показатели классификации молока по редуктазе представлены в таблице 20.

При определении санитарно-показательных микроорганизмов в молоке (табл. 21) учитывают наличие и количество бактерий группы кишечной палочки. БГКП являются постоянными обитателями кишечного тракта человека и животных, они находятся в кормах, почве и подстилке, поэтому получить молоко без кишечной палочки довольно сложно. При попадании в молоко эти бактерии вызывают различные пороки, изменяя вкус, запах и консистенцию молока.

Для характеристики санитарно-гигиенических условий производства и реализации молока устанавливают степень обсеменения продукта бактериями группы кишечной палочки, т. е. определяют коли-титр (табл. 22).

Титр — это наименьшее количество продукта, выраженное в мл (г), в котором обнаружены БГКП. Согласно ГОСТ, титр кишечных палочек в молоке и молочных продуктах определяют трехэтапным бродильным методом. При этом учитывают цитратотрицательные разновидности кишечных палочек, которые не растут на средах Козера или Симонсона.

Классификация молока по редуктазе

Класс молока	Оценка качества	Продолжительность обесцвечивания	Количество бактерий в 1 мл молока
1	хорошее	свыше 5 ч 30 мин	менее 500 тыс.
2	удовлетворительное	свыше 2 ч до 5 ч 30 мин	от 500 тыс до 4 млн
3	плохое	свыше 20 мин до 2 ч	от 4 млн до 20 млн
4	очень плохое	20 мин и менее	20 млн и выше

Микробиологические нормативы показателей молока

Продукт	МАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются БГКП, сальмонеллы		Примечание
Молоко пастеризованное в потребительской таре	100 000	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 г не допускаются
Молоко пастеризованное во флягах	200 000	0,01	25	То же
Сливки пастеризованные в потребительской таре	100 000	0,01	25	То же
Сливки пастеризованные во флягах	200 000	0,01	25	То же

Коли-титр молока и молочных продуктов

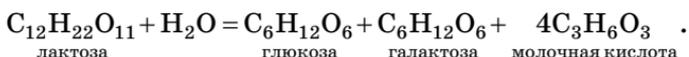
Варианты	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах молока, мл						Вычисленные коли-титры, мл
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
А	–	–	–	–	–	–	Более 3,0
Б	+	–	–	–	–	–	Равен 3,0
В	+	+	+	+	+	–	Менее 0,3
	+	+	–	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	

Примечания. 1. Если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаружено кишечной палочки, то считают коли-титр более 3,0 мл. 2. Если в одном из засеянных объемов по 1 мл продукта обнаружена кишечная палочка, считают, что коли-титр равен 3,0 мл. 3. Если кишечная палочка обнаружена в пяти посевах или во всех объемах продукта, то считают коли-титр менее 0,3 мл. 4. Во всех остальных случаях считают коли-титр равным 0,3 мл.

Результаты бактериологического исследования качества готовой продукции из-за длительности анализов не могут быть использованы для задержки выпуска молочной продукции, но по ним судят о санитарно-гигиеническом благополучии предприятия.

19.7. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы выделяют фермент лактазу, расщепляющую дисахарид лактозу на 2 молекулы моносахаридов: глюкозу и галактозу.



Таким образом, из одной молекулы сахара лактозы образуются четыре молекулы молочной кислоты. В молоке повышается кислотность, содержащийся в нем казеин свертывается и образует сгусток.

В некоторых кисломолочных продуктах наряду с молочнокислым протекает и спиртовое брожение. В связи с этим различают продукты молочнокислого брожения: сметана, простокваша, ацидофильное молоко; смешанного (молчнокислого и спиртового) брожения: кумыс, кефир, катык и др.

19.7.1. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

После пастеризации молоко охлаждают до температуры сквашивания кисломолочного продукта. В зависимости от вида приготавливаемого продукта применяют различную температуру при сквашивании: для мезофильных микроорганизмов — 30–35°C; для термофильных микроорганизмов — 40–42°C.

Чтобы получить кисломолочный продукт желательной консистенции с выраженным вкусом и ароматом, необходима хорошая закваска. На молочных заводах применяют закваски, состоящие из чистой культуры молочнокислых бактерий, полученных из ВНИИМП (Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности). Каждая культура должна иметь паспорт, в котором указаны морфологические и

тинкториальные свойства, температурный оптимум, способность ферментировать молочную кислоту до 110 или 300°Т и выделять ароматические соединения.

Чаще применяются следующие виды молочнокислых микроорганизмов:

- молочнокислый стрептококк — *Streptococcus lactis*, *Str. thermophilus*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*;
- молочнокислые палочки — *Lactobacterium bulgaricum*, *L. acidophilus*.

Для каждого кисломолочного продукта применяется своя специфическая закваска. Отличие между ними заключается в том, что в каждой закваске находится один или несколько видов микроорганизмов, которые, развиваясь в продукте, придают ему нужные, характерные свойства.

Чистоту закваски, а также количественное соотношение между ее компонентами проверяют ежедневно, путем приготовления из закваски и готовых кисломолочных продуктов препаратов на предметном стекле, окрашиванием и изучением их под иммерсионным микроскопом.

После заквашивания кисломолочный продукт разливают в потребительскую тару, охлаждают до 4–6°С и отправляют на склад.

19.7.2. ПРОДУКТЫ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

Ацидофильное молоко относится к продуктам молочнокислого брожения, для приготовления применяется ацидофильная палочка. Ацидофильная палочка в отличие от других молочнокислых бактерий хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте. Это объясняется тем, что ацидофильные бактерии относятся к постоянным обитателям желудочно-кишечного тракта молодняка и детей, находящихся на молочном вскармливании. При переходе на смешанное кормление ацидофильная палочка заменяется другими микроорганизмами. Ацидофильная палочка образует больше молочной кислоты, антибиотических веществ, чем другие молочнокислые бактерии, которые губительно действуют на гнилостные, болезнетворные виды бактерий. Поэтому рекомендуют использовать ацидофильные препараты в качестве пробиотиков для профилактики и лечения

болезней желудочно-кишечного тракта при дисбактериозе, а также для ускорения восстановления полезной микрофлоры кишечника после приема антибиотиков.

Для приготовления ацидофильного молока в пастеризованное и охлажденное до 42°C молоко вносят 3% закваски, содержащей чистую культуру *L. acidophilum*, перемешивают и ставят в термостат при 42°C, сгусток образуется через 6–8 ч, он должен иметь однородную, тягучую консистенцию.

Для контроля чистоты закваски из готового продукта бактериологической петлей берут каплю и наносят на предметное стекло, готовят мазок, окрашивают метиленовой синью. При микроскопии препаратов из ацидофильного молока в поле зрения обнаруживаются крупные палочки, расположенные одиночно или в виде коротких цепочек, без присутствия посторонней микрофлоры.

Сметана. В пастеризованные и охлажденные до 30°C сливки вносят 0,5–3% закваски, состоящей из чистой культуры *Str. lactis* или *Str. cremoris*. Заквашивание происходит через 8–10 ч.

При микроскопии препаратов, приготовленных из сметаны, в поле зрения должны быть видны молочнокислые стрептококки, расположенные парно или в виде коротких цепочек без присутствия посторонней микрофлоры.

Простокваша. В домашних условиях для приготовления простокваши сырое молоко ставят в теплое место на 6–8 ч. В нем последовательно проходят все фазы — от бактерицидной до молочнокислой, при этом накапливается молочная кислота и образуется сгусток. Молоко в фазе молочнокислого брожения называется простоквашей, которую для предотвращения повышенной кислотности ставят в холодное место для созревания. При микроскопии препаратов, приготовленных из простокваши, преобладают молочнокислые стрептококки.

19.7.3. ПРОДУКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО БРОЖЕНИЯ

Кефир — кисломолочный продукт смешанного брожения, для приготовления которого используются кефирные грибки. Они имеют определенную структуру и ведут себя биологически, как живой саморегулирующийся организм: растут, делятся и обладают наследственностью.

При гистологическом исследовании срезов видны переплетения нитей, которые образуют строму грибка, удерживающую остальную группу микроорганизмов состоящую из мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*); мезофильных молочнокислых палочек (*Beta-* и *Streptobacterium*); термофильных молочнокислых палочек (*L. casei*); молочных дрожжей, прочно связанных со стромой гриба.

Молочнокислые бактерии, гидролизуя лактозу, снабжают молочные дрожжи кислотой, необходимой им для жизнедеятельности, а дрожжи, вызывая спиртовое брожение, насыщают продукт углекислотой, что придает кефиру особый вкус.

Методика приготовления грибковой кефирной закваски: в пастеризованное и охлажденное до 20°C молоко вносят 5% кефирных зерен, заквашивание происходит в течение 12–14 ч. Затем грибковую закваску процеживают через сито и используют, как производственную закваску для приготовления потребительского кефира, у которого определяют вкус, запах и качество сгустка.

Качество закваски регулярно проверяют, определяют активность (скорость сквашивания, кислотность), органолептические качества, наличие посторонней микрофлоры путем просмотра микроскопического препарата в 10 полях зрения микроскопа.

Кумыс — кисломолочный напиток, готовят из кобыльего молока, которое сильно отличается от коровьего по химическому составу (жира — 1,5–2,0%, сахара — до 6%).

В молоке кобылиц преобладает альбумин (у коров — казеин), который при воздействии молочной кислоты образует рыхлый осадок, неплотный сгусток с мелкими хлопьями, благодаря этому сквашенное кобылье молоко остается однородным, без осадка.

Кумыс, как и кефир, является продуктом смешанного брожения. В результате большого содержания молочного сахара деятельность дрожжей активизируется, и количество спирта у зрелого кумыса доходит до 2,5%.

При получении кобыльего молока необходимо строго соблюдать все санитарно-гигиенические требования, так как кобылье молоко нельзя пастеризовать. При пастеризации оно свертывается, поэтому закваску вносят в парное непастеризованное кобылье молоко.

Методика приготовления кумыса. В парное молоко вносят закваску, состоящую из болгарских молочнокислых палочек и дрожжей рода *Torula*. Оптимальная температура заквашивания — 26°C (при высокой температуре происходит молочнокислое брожение, при низкой — спиртовое), сквашивание происходит за 6–8 ч.

При получении кумыса в домашних условиях в качестве закваски применяют кумыс прежней выработки.

19.8. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СВЕЖЕЙ РЫБЫ И МОРЕПРОДУКТОВ

Мышцы рыб в нормальных условиях стерильны. Порча продукта наступает после гибели рыбы. В отличие от мяса теплокровных животных, порчу которых вызывают преимущественно мезофильные гнилостные микроорганизмы, возбудителями гнилостного разложения рыбы являются чаще психрофильные бактерии, активное размножение которых происходит при низкой температуре. Поэтому она еще более подвержена порче, чем мясо животных и птиц.

Микроорганизмы попадают через жабры, кишечник, особенно в период агонии. Микроорганизмы, находящиеся на поверхности тела рыбы, покрытой слизью, являющейся хорошим питательным субстратом для их развития, быстро размножаются и со временем проникают в глубь мягких тканей. Особенно обильно загрязняется рыба при вскрытии брюшка, так как при этом неизбежно повреждается кишечник.

Визуальная и органолептическая оценка. Свежая рыба имеет красные жабры, светлые выпуклые глаза, специфический рыбный запах. На разрезе мышечная ткань эластичная, плотной консистенции, ямка от надавливания быстро выравнивается и исчезает. Несвежая рыба имеет темно-бурые жабры, мутные запавшие глаза, дряблую консистенцию, неприятный гнилостный запах, внутренние органы распавшиеся, а кишечник лизированный.

Микроскопическое исследование рыбы проводят для объективной оценки, если доброкачественность сырья вызывает сомнение. Перед исследованием рыбы кожу посередине спины или

ближе к голове освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Затем стерильным скальпелем вырезают кусочки мышечной ткани рыбы площадью около 1,5 см² и толщиной 1,5–2,0 см, один из них берут из поверхностных слоев мышц, расположенных под кожей, другой — из мышечной ткани глубоких слоев, находящихся около позвоночника. Вырезанным кусочком делают препарат-отпечаток на предметном стекле, препарат фиксируют в пламени горелки, окрашивают простым методом и просматривают не менее 10 полей зрения под иммерсией.

В препаратах-отпечатках, приготовленных из свежей рыбы, не заметны остатки разложившейся мышечной ткани, а в препаратах из поверхностных слоев бактерий нет или видны единичные кокки и палочки.

У рыбы сомнительной свежести в мазках из глубоких слоев мышц находят 10–20, а в мазках из поверхностных слоев 30–50 бактерий в одном поле зрения (диплококков, палочек). На стекле заметны следы распавшейся ткани мышц, препарат окрашен удовлетворительно.

В препарате, приготовленном из рыбы, непригодной в пищу, в поле зрения, как из поверхностных, так и из глубинных слоев видны сотни палочек. Среди них могут быть спорообразующие палочки, флуоресцирующие бактерии, кишечная палочка, вульгарный протей и т. д. Препарат хорошо окрашен, на стекле много следов распавшейся мышечной ткани.

Таблица 23

**Микробиологические нормативы
свежей рыбы и морских беспозвоночных**

Наименование продукта	МАФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается содержание		
		БГКП	золотистого стафилококка	патогенных МО*, в том числе сальмонелл
Рыба свежая, охлажденная, мороженая	5·10 ⁴	0,001	0,01	25
Морские беспозвоночные	1·10 ⁵	0,001	0,01	25
Икра осетровых	1·10 ⁴	1,0	—	—

* Парагемолитический вибрион и листерии должны отсутствовать в 25 г морских беспозвоночных, подготовленных к реализации в живом виде.

Микробиологическое исследование проводят при стойкой повышенной обсемененности готовой продукции для выявления источников обсеменения. Контроль включает определение в сырье количества МАФАМ, дополнительно определяют наличие БГКП, золотистых стафилококков, сальмонелл, а в морской рыбе — наличие паразитического вибриона.

Микробиологические анализы морских беспозвоночных (устриц, мидий и др.), подготовленных к реализации в живом виде, проводятся систематически, при этом контролируется каждая новая партия.

В таблице 23 приведены микробиологические нормативы количества МАФАМ, БГКП, золотистого стафилококка и сальмонелл.

19.9. МИКРОФЛОРА МЕДА И ПРОДУКЦИИ ПЧЕЛОВОДСТВА

К болезням пчел относятся: американский гнилец, европейский гнилец, мешоточный расплод, вирусные параличи, энтеробактериозы, спироплазмозы, аспергиллезы, аскофероз и меланоз.

Американский гнилец является наиболее опасным заболеванием медоносной пчелы. Споры возбудителя очень устойчивы во внешней среде, способны выживать многие годы в корме пчел, почве и т. д. Споры в воске при 121°C погибают через 30 мин, в меде при 100°C — спустя 160 мин, при 100°C — через 41 мин. В спиртовом растворе прополиса они сохранялись более 45 дней.

Европейский гнилец имеет более широкое распространение, чем американский. Возбудитель устойчив к высушиванию, сохраняет жизнеспособность при комнатной температуре в меде до 7 мес., в тестообразной массе из пыльцы и воды — 10 мес., в сотах — 40–45 дней. Устойчив к высушиванию в меде до 256 дней, в перге и медоперговой смеси — 129 дней. В меде при 79°C — 10 мин. Споры выживают в меде до 450 дней.

В сотовом меде и на поверхности тела здоровых медоносных пчел может быть обнаружен возбудитель эшерихиоза — кишечная палочка.

Мед и пергу из больных аспергиллезом семей нельзя использовать для кормления пчел. Перга подлежит уничтожению. Мед при исключении наличия афлотоксинов может быть использован после термической обработки в кондитерской промышленности. Воск с неблагополучной пасеки направляют на технические цели.

Аскофероз — грибная болезнь пчел, проявляющаяся поражением личинок (предкуколок) трутней, рабочих пчел и маток. Плесневый гриб передается с медом и сотами, ульями и загрязненным оборудованием неблагополучных семей.

Исследование меда проводят только при необходимости.

19.10. МИКРОБИОЛОГИЯ ЗЕРНА, МУКИ И ХЛЕБНЫХ ПРОДУКТОВ

Зерно, находящееся в колосе, содержит значительное количество микроорганизмов. По мере созревания зерна количество микроорганизмов возрастает, в 1 г зрелого зерна содержатся десятки тысяч микроорганизмов. Во время уборки и при обмолоте снопов зерно загрязняется микробами, попадающими на него с пылью и частицами почвы.

В зерне широко представлены споровые аэробные бактерии (*Bac. subtilis*, *Bac. measentericus*, *Bac. mycoides* и др.), палочки протей, кишечная палочка, молочнокислые, маслянокислые бактерии и различные плесневые грибки (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Oidium*).

При хранении зерна, особенно если оно влажное, количество микробов может быстро возрастать. Вначале размножаются кокковые формы, позднее начинают преобладать разные споровые и бесспоровые палочки. Даже кратковременное размножение микроорганизмов сказывается на качестве зерна: на нем появляются пятна, оно темнеет и приобретает затхлый запах. Сушка зерна несколько снижает количество микробов, в результате снижения влажности создаются неблагоприятные условия для их размножения.

Зерно перед переработкой необходимо очистить от примесей и загрязнения. Перед размолотом зерно просеивают, продувают и лущат на машинах, сбивающих с зерен грязь, оболочки и частично зародыши. Хорошая очистка значительно (в 2 раза и более) снижает количество микроорганизмов в зерне.

При помоле зерна микробы с поверхности зерна частично переходят в муку. В крупу, так же как в муку, переходит большее или меньшее число микробов в зависимости от способа очистки и обработки зерна. При благоприятных условиях оставшиеся в муке и крупе микроорганизмы могут развиваться и вызывать порчу продукта.

Прокисание муки связано с разложением микробами сахаров, образующихся при осахаривании крахмала.

Плесневение муки — распространенная форма порчи при повышенной влажности, при этом появляется запах плесени и затхлости.

Микробиологические процессы в тесте вызываются двумя видами микроорганизмов — дрожжами и молочнокислыми бактериями.

Дрожжи являются возбудителями спиртового брожения, превращение углеводов в спирт сопровождается обильным выделением углекислоты и побочных продуктов, придающих хлебу специфический вкус и аромат, выгодно отличающий его от хлеба, разрыхленного химическим способом (при помощи пекарских порошков, например углекислого аммония, распадающегося при выпечке с образованием CO_2).

Молочнокислые микроорганизмы расщепляют углеводы до молочной кислоты и некоторых летучих кислот, в частности, уксусной. Накопление кислоты в пшеничном тесте сравнительно невелико, в ржаном хлебе оно значительно.

Ржаное тесто замешивают с применением закваски, содержащей кроме дрожжей и молочнокислые бактерии. Оптимальная температура для спиртового брожения — 26°C , а для образования молочной кислоты — $35\text{--}40^\circ\text{C}$. В связи с этим брожение проводят в два этапа: первый — при температуре, оптимальной для развития дрожжей, второй — для молочнокислых бактерий.

Для приготовления пшеничного теста используют только дрожжи, молочнокислое брожение развивается за счет случайной (дикой) микрофлоры, содержащейся в муке.

Для приготовления теста обычно применяются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые также используются и в спиртовой промышленности. Прессованные дрожжи готовят на дрожжевых заводах. Чистая культура дрожжей из лаборатории поступает в специальный цех для получения маточной закваски

дрожжей, из которой готовят производственные закваски. Очень важно избежать загрязнения чистой культуры посторонней микрофлорой, особенно дикими дрожжами, которые обладают слабой ферментативной активностью.

Выпечку хлеба производят при температуре от 240 до 320°C, в зависимости от величины изделий и качества муки. На границе корки и мякиша расположена зона испарения, происходящего при температуре 100°C. Во внутренних слоях теста температура повышается постепенно. Благодаря защитному действию коллоидов в хлебе создаются благоприятные условия для сохранения микроорганизмов. После выпечки в мякише хлеба сохраняются не только споры бактерий, но и беспоровые кислотообразующие бактерии и дрожжи.

Хотя возможность сохранения в хлебе патогенных бактерий нельзя исключить, однако в санитарно-эпидемиологическом отношении большую опасность представляет загрязнение, происходящее в процессе транспортировки, хранения и продажи.

Болезнями печеного хлеба называют различные изменения, возникающие в нем в результате жизнедеятельности микроорганизмов, делающих хлеб непригодным для применения в пищу.

Картофельная (тягучая) болезнь хлеба характеризуется тем, что мякиш превращается в липкую, иногда слизистую массу, окрашенную в желто-бурый или коричневый цвет, и издающую отвратительный запах. Хлеб, пораженный картофельной болезнью, при употреблении в пищу небезопасен для здоровья.

Возбудителями картофельной болезни хлеба являются аэробные спорообразующие бактерии. В пораженном хлебе чаще встречается картофельная палочка (*Bac. mesentericus*), *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides* и некоторые другие спорообразующие бактерии.

Все споровые палочки — возбудители картофельной болезни хлеба — предпочитают для своего развития нейтральную или слабощелочную реакцию. Поэтому, хотя ржаной хлеб в большей степени, чем пшеничный, обсеменен этими бактериями, он не подвержен картофельной болезни благодаря своей высокой кислотности. Этот порок поражает, главным образом, пшеничный хлеб, приготовленный из пшеничной муки низко помола, обильно зараженный бактериями.

Картофельная болезнь возникает при длительном хранении хлеба при достаточно высокой температуре, чаще — в жаркое время года. Поражаются преимущественно крупноштучные хлебные изделия, стерилизация мякиша которых при выпечке происходит недостаточно.

19.11. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРМОВ

Прикорневая и корневая система растений обсеменена большим количеством различной микрофлоры. В корневой зоне (ризосфере) имеется большое количество отмирающих корневых остатков — питательного субстрата для сапрофитной почвенной микрофлоры. Эти бактерии относятся к гниlostным, как и некоторые представители кишечной группы, встречающиеся в корневой зоне растений. Кроме них ризосфера содержит значительное количество гетероферментативных молочно-кислых бактерий, а число спорообразующих бактерий возрастает лишь после отмирания корневой системы. Из плесневых грибов преобладают *Penicillium*, *Fusarium*.

Некоторые обитающие у корня бактерии и микроскопические грибы постепенно переходят на наземную часть растущего растения и расселяются на ней. На поверхности растений способна существовать лишь определенная группа микроорганизмов, получившая название эпифитной. На поверхности растений содержатся аммонификаторы, маслянокислые бактерии, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечной палочки и представители других физиологических групп микроорганизмов. В отличие от других микробов эпифиты хорошо переносят действие фитонцидов, солнечных излучений и питаются веществами, выделяемыми растениями. Находясь на поверхности растений, эпифиты не повреждают и не проникают в ткани здорового растения. Большая роль в этом процессе принадлежит естественному иммунитету и бактерицидным веществам, которые выделяют растения. Так, все растения выделяют фитонциды, которые влияют на физиологические процессы микробов.

После скашивания растений нарушается проницаемость клеток, разрушаются бактерицидные вещества, которые препятствовали проникновению микробов в их ткани. Активизиру-

ются все микроорганизмы, находившиеся на поверхности растений: гнилостные, маслянокислые, молочнокислые бактерии, плесневые грибы и др. Микроорганизмы и прежде всего грибы при интенсивном их развитии снижают качество корма и его питательную ценность. Под действием *Aspergillus*, *Penicillium* изменяются жиры, затем — углеводы и белки; в корме накапливаются различные продукты распада, резко изменяющие запах и вкус корма, среди них органические жирные кислоты, аммиак и пептоны. Эти процессы особенно активно протекают при высокой влажности и температуре.

В глубинных слоях корма развиваются анаэробные бактерии, а на поверхности — аэробные бактерии и плесневые грибы. В результате их жизнедеятельности происходит разложение составных частей корма, что приводит к потере питательных веществ и порче корма. Он приобретает гнилостный запах, волокна легко разрываются, их консистенция становится мажущейся. Такой корм плохо поедается животными и может вызвать кормовые отравления.

19.11.1. СЕНО

Сушка — старый и наиболее распространенный способ консервирования зеленой массы и других кормов (зерно, солома). Суть этого процесса заключается в том, что при сушке микробиологические процессы в корме приостанавливаются из-за удаления из него «свободной» воды, которая составляет большую часть имеющейся в корме влаги. Так, если в свежей траве содержится 70–80% влаги, то в сене всего 12–16%. Оставшаяся в корме вода представляет собой «связанную» воду и не может поддержать развитие микроорганизмов. Таким образом, задача сушки — удаление избыточной воды из корма с наименьшей потерей органических веществ. При сушке число жизнедеятельных микроорганизмов, находящихся на поверхности кормов, постепенно уменьшается, тем не менее в них всегда можно найти большее или меньшее число эпифитной и сапрофитной микрофлоры, попавшей из воздуха и почвы.

Размножение сапрофитной микрофлоры в результате повышения влажности приводит к заметному повышению температуры. Это повышение температуры, связанное с жизнедеятельностью микроорганизмов, получило название **термогенез**.

Приготовление обыкновенного сена. Сено готовят из скошенных трав, которые имеют влажность 70–80% и содержат большое количество свободной воды. Такая вода создает благоприятные условия для размножения эпифитной микрофлоры, вызывающей гниение травы. Высушивание травы до влажности 12–17% приостанавливает микробиологические процессы, тем самым прекращая разрушение высушенных растений.

После высушивания в сене сохраняется большое количество эпифитной микрофлоры, но так как при этом нет условий для ее размножения, то она находится в анабиотическом состоянии. При попадании воды на высушенное сено деятельность микроорганизмов начинает активизироваться, что приводит к росту температуры до 40–50°C и выше. При самонагревании растительной массы происходит четко выраженная смена микрофлоры. Сначала в греющейся массе размножаются мезофильные бактерии, затем на смену им приходят термофилы, способные развиваться при температуре до 75–80°C. Обугливание растительной массы начинается при температуре около 90°C, когда микроорганизмы прекращают свою деятельность, дальнейшие процессы протекают химическим путем. Образуются горючие газы — метан и водород, которые адсорбируются на пористой поверхности обуглившихся растений, вследствие чего может произойти самовоспламенение. Воспламенение происходит лишь при наличии воздуха и недостаточно уплотненной растительной массе.

Микроорганизмы используют не всю энергию потребленных ими питательных веществ, избыток энергии выделяется в окружающую среду главным образом в виде тепла.

Приготовление бурого сена. Чем выше температура согревающегося корма, тем ниже его качество. Но не всегда явление термогенеза вредно. В северных районах, где мало тепла и высокая влажность, его используют для приготовления бурого сена. Для просушивания корма применяют не солнечную энергию, а тепло, выделяемое в результате жизнедеятельности микроорганизмов, развивающихся в растительной массе. Скошенную и хорошо провяленную траву складывают в небольшие копны, затем — в стога и скирды. Так как в растительной массе еще содержится свободная вода, начинают размножаться микроорганизмы, выделяется тепло, которое и досушивает расте-

ния. Через месяц при угасании микробиологических процессов происходит охлаждение растительной массы, которая может храниться длительное время. Сено, приготовленное таким образом, теряет естественную окраску, становится бурым, но охотно поедается животными.

19.11.2. СЕНАЖ

Это разновидность консервированного корма, получаемого из провяленных трав, главным образом бобовых, убранных в начале бутонизации. Технология приготовления сенажа включает скашивание, плющение и закладку провяленной травы в хранилище. Получить доброкачественный сенаж и до минимума сократить его потери при хранении можно только при закладке корма в капитальные хранилища — башни и траншеи. Траншеи по сравнению с башнями более просты и удобны в эксплуатации. Для приготовления высококачественного сенажа в хранилища закладывают мелко измельченные растения (размер частиц — 2–3 см), что обеспечивает сыпучесть и уплотнение корма, тщательно утрамбовывают массы. Заготовку сенажа надо провести в 2–4 дня, то есть в сжатые сроки. Недостаточное уплотнение и продолжительные сроки закладки вызывают нежелательное повышение температуры, что ухудшает перевариваемость и потери органического вещества корма.

После загрузки хранилища сенаж укрывают слоем свежескошенной травы, затем — полиэтиленовой пленкой и сверху — слоем земли и торфа.

От степени герметизации хранилища зависят сохранность и качество сенажа, так как при доступе воздуха начинают размножаться гнилостные и плесневые микроорганизмы, приводящие к порче корма.

В отличие от обычного силоса (см. далее), сохранность которого обуславливается накоплением органических кислот до рН 4,2–4,4, консервирование сенажа достигается за счет физиологической сухости исходного сырья, сохраняемого в анаэробных условиях. Если влажность консервируемой массы будет в пределах 40–50%, то она хорошо ферментируется и даже при дефиците углеводов дает корм высокого качества. При этом рН корма может быть довольно высоким — около 5,0. Это объясняется тем, что гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим

давлением, чем молочнокислые бактерии. При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, когда несколько подсушенную массу закладывают в специальную траншею, как при холодном силосовании.

Сенаж по своим свойствам ближе к зеленой массе, чем обычный силос. Это пресный корм, его кислотность соответствует величине рН 4,8–5,0, в нем почти полностью сохраняется сахар, в то время как у силоса он превращается в органические кислоты.

При влажности растений 70–80% интенсивно развиваться может лишь плесень. Плесени — строгие аэробы, поэтому непременным условием приготовления сенажа является надежная изоляция его от воздуха. Оставшийся в консервируемой массе воздух быстро поглощается дыханием еще живых клеток растений, и все свободное пространство между частицами измельченного корма заполняется углекислым газом.

Таким образом, для приготовления сенажа необходимо выполнить два условия:

- 1) снизить влажность растений до 45–55%;
- 2) создать строгие анаэробные условия, чтобы предотвратить развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов.

Технология приготовления сенажа основана не только на физических, но и на микробиологических процессах, которые протекают медленнее, чем в силосе. В силосе максимальное количество микроорганизмов накапливается уже к 7-му дню, а в сенаже их численность достигает максимума только на 15-й день, т. е. молочнокислое брожение в сенаже протекает значительно слабее, чем при силосовании и зависит от влажности и вида консервируемого сырья. Поэтому показатель рН в сенаже выше, чем в силосе и колеблется от 4,4 до 5,6. По данным А. А. Зубрилина с соавторами (1967), количество молочнокислых микробов в сенаже в 4–5 раз меньше, чем в силосе. В связи с этим в сенаже, по сравнению с силосом, содержится больше неиспользованного сахара. Так, если в силосе весь сахар превращается в органические кислоты, то в сенаже сохраняется около 80% сахара. В результате создания неблагоприятных условий для развития микрофлоры в консервируемом корме, исключения утечки сока и механических потерь листьев и соцветий

при заготовке и хранении сенажа, общие потери питательных веществ в сенаже не превышают 13–17%. Таким образом, сенаж совмещает в себе положительные качества сена и силоса.

В отличие от силоса сенаж, имея низкую влажность, не замерзает, что упрощает его выгрузку и скармливание животным. Сенаж можно заготавливать из всех трав, так как в отличие от силоса не имеет значения, сколько в траве содержится легкосбраживаемых углеводов и к какой группе по силосуемости относятся эти растения.

19.11.3. МИКРОБИОЛОГИЯ СИЛОСОВАНИЯ КОРМОВ

Термин «силос» (*silos*) очень древнего происхождения, на испанском языке он означает «яма для хранения зерна» (в настоящее время слово утратило первоначальное значение). Такие зернохранилища были распространены во многих местностях побережья Средиземного моря. Уже за 700 лет до н. э. землевладельцы Греции, Турции, Северной Африки широко использовали такие ямы для хранения зерна. Со временем этот принцип был использован для хранения и консервирования зеленой массы.

Силосование — сложный микробиологический и биохимический процесс консервирования сочной растительной массы. Суть его заключается в том, что в результате сбраживания растительных углеводов ферментами молочнокислых бактерий в силосуемой массе накапливается молочная кислота, обладающая антимикробными свойствами, в результате чего корм не подвергается гниению и приобретает стойкость при хранении.

Для получения силоса хорошего качества и с наименьшими потерями необходимо создать следующие условия.

1. Использовать для силосования корма, содержащие достаточное количество легкосилосующихся углеводов (кукуруза, подсолнечник, горох, зеленый овес, луговые злаки) или их добавлять в несилосующиеся растения.

2. Оптимальная влажность для силосования — 65–75%, при ней происходит интенсивное образование органических кислот. При пониженной влажности силосуемая масса плохо уплотняется, в ней много воздуха и создаются условия для самонагревания, развития плесени и гнилостных бактерий.

3. Оптимальная температура для развития молочнокислых бактерий — 25–30°C, при ней идет нормальный процесс заквашивания корма с небольшими потерями питательных веществ. Готовый силос получается умеренно кислый, желто-зеленого цвета, с приятным специфическим запахом.

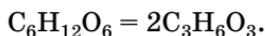
4. Хорошо изолировать силосуемую массу от воздуха для создания анаэробных условий, которые неблагоприятны для размножения гнилостных и плесневых микроорганизмов.

Бактерии, вырабатывающие молочную кислоту, — это большая разнообразная группа, в которую входят как кокковидные, так и палочковидные формы.

По качеству продуктов брожения молочнокислые бактерии делятся на:

- гомоферментативные, образующие из сбраживаемых ими углеводов в основном молочную кислоту и лишь следы различных побочных продуктов. Типичные представители этой группы — молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки. При таком брожении получается продукт с приятным кислым вкусом и запахом;
- гетероферментативные, образующие кроме молочной кислоты значительное количество побочных продуктов (этилового спирта, уксусной кислоты, углекислого газа). Среди них имеются кокковые и палочковидные формы.

Для развития всех молочнокислых бактерий в растительной массе должны быть легкоусвояемые углеводы. Способность вырабатывать молочную кислоту изменяется у одного и того же вида микроорганизмов от многих факторов, в том числе и от качества питательного субстрата. Так, при сбраживании гексоз они образуют в качестве главного продукта молочную кислоту, которая получается в результате расщепления одной молекулы сахара на две молекулы молочной кислоты по следующему уравнению:



При сбраживании пентоз в конечных продуктах брожения будет всегда больше уксусной кислоты, чем при сбраживании, например гексоз глюкозы или фруктозы. А так как пентозаны входят в состав растительной массы, наличие в готовом силосе уксусной кислоты также является результатом жизнедеятель-

ности молочнокислых, а не уксуснокислых бактерий. Поэтому даже в хорошем силосе всегда находится определенное количество уксусной кислоты (Даниленко И. А. с соавт., 1972). И если в составе органических кислот будет не менее 65–70% молочной, а уксусной — 30–35%, то значит, брожение происходило правильно.

Известны два способа силосования — холодный и горячий.

Холодный способ характеризуется тем, что созревание силоса происходит при температуре 25–30°C. При таком силосовании измельченную растительную массу плотно укладывают в траншею, а сверху изолируют от воздуха для создания анаэробных условий, когда развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов подавляется. Непременное условие получения высококачественного корма — быстрая изоляция силосуемой массы от воздуха, поэтому продолжительность заполнения траншеи зеленой массой не должна превышать 3–4 дней. Для предотвращения термогенеза необходимо укладывать измельченную зеленую массу быстро и непрерывно, при постоянном уплотнении.

При **горячем способе** зеленую массу укладывают рыхло, слоем 1–1,5 м на 1–2 дня, затем укладывают второй слой такой же толщины, как и первый. При доступе кислорода в растительной массе развиваются энергичные микробиологические процессы, в результате чего температура корма поднимается до 45–50°C. Нижний слой растений, размягченный высокой температурой, спрессовывается под тяжестью нового слоя корма. Это вызывает удаление воздуха из нижнего слоя, поэтому аэробные процессы прекращаются, и температура начинает снижаться. Последний верхний слой утрамбовывают и плотно прикрывают для защиты от воздуха. Перегретый силос имеет коричневый цвет, запах яблок или ржаного хлеба, хорошо поедается животными. Однако кормовая ценность силоса, приготовленного горячим способом, значительно ниже, чем при холодном способе.

Процесс силосования можно условно разделить на три фазы.

1-я фаза — смешанной микрофлоры. В растительной массе начинается бурное развитие эпифитной микрофлоры (гнилостной, молочнокислой, маслянокислой, микроскопических грибов), внесенной с кормом. Продолжительность первой фазы зависит от качества корма, плотности укладки, температуры окружающей среды, но чаще бывает кратковременной.

Во 2-й фазе — **главного брожения** — основную роль играют молочнокислые бактерии, выделяющие молочную кислоту. При оптимальном содержании сахара в растительной массе интенсивное молочнокислое брожение приводит к образованию значительного количества органических кислот (в основном молочной), которое необходимо для подкисления корма до pH 4,2–4,4 (Макарец Н. Г., 1999). В начале этой фазы размножаются кокки, затем, по мере нарастания кислотности, им на смену приходят кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Молочная кислота обладает антимикробными свойствами, поэтому большинство гнилостных бактерий погибает, но спорообразующие формы в виде спор могут длительное время сохраняться в силосованном корме.

3-я фаза — конечная, связана с постепенным отмиранием возбудителей молочнокислого брожения в созревающем силосе. Молочная кислота при накоплении в большой концентрации становится вредной и для молочнокислых палочек, которые наряду с оставшимися кокками начинают отмирать. Таким образом, количество бактерий в корме уменьшается, и процесс силосования подходит к естественному завершению.

В состав эпифитной микрофлоры растительного сырья входят различные микроорганизмы (микроскопические грибы, маслянокислые бактерии, кишечная палочка), которые при нарушении технологического процесса могут активизироваться и вызывать нежелательные процессы.

Плесневые грибы хорошо переносят кислую среду (pH до 1,2) и активно размножаются в силосе при плохой изоляции от воздуха. Для своей жизнедеятельности они используют углеводы, а при их недостатке — молочную и уксусную кислоты. При этом значительно ухудшается качество силоса и отмечается токсическое воздействие заплесневелого корма на организм животного. Надежными мерами для предотвращения развития плесневых грибов в силосе являются хорошая герметизация силосохранилищ и создание благоприятных условий для развития молочнокислого брожения.

Бактерии группы кишечной палочки являются гетероферментативными микроорганизмами, которые кроме сахаролитических выделяют и протеолитические ферменты, расщепляющие растительные белки до аммиака, таким образом снижая ценность силосуемого корма.

Нежелательны для процесса силосования и маслянокислые бактерии, являющиеся строгими анаэробами. В процессе жизнедеятельности они используют сахар, молочную кислоту, некоторые аминокислоты. Это сопровождается гнилостным распадом белка, накоплением масляной кислоты и других, вредных для организма животных побочных продуктов. Наличие масляной кислоты является индикатором гнилостного разложения белка при слабом нарастании в силосе молочной кислоты. Снижение рН среды до 4,2 предотвращает развитие маслянокислого брожения при силосовании кормов.

19.11.4. ДРОЖЖЕВАНИЕ КОРМОВ

Это микробиологический метод подготовки кормов к скармливанию. В химическом составе дрожжей содержится 48–52% белков, 13–16% углеводов, 2–3% жиров, 22–40% безазотистых экстрактивных веществ и 6–10% золы. В состав дрожжей входят многие незаменимые аминокислоты: аргинин, гистидин, лизин, лейцин, тирозин, треонин, фенилаланин, метионин, валин, триптофан, которых мало в кормах растительного происхождения. В дрожжах много витаминов группы В, провитамин витамина D₂, а также витамины Е, С и др. И в отличие от других источников белка они обладают большой скоростью размножения и нетребовательны к качеству источников питательных веществ. Применение дрожжей не случайно: например, 500 кг дрожжей дают за сутки 80 кг белков, а у быка того же веса суточный привес составляет в лучшем случае 500 г белка.

При дрожжевании кормов необходимо создать благоприятные условия для размножения дрожжевых клеток: наличие легкосбраживаемых углеводов, содержащих моно- или дисахариды, достаточной аэрации (иначе дрожжи перейдут на анаэробный тип дыхания, конечным продуктом которого является этиловый спирт), благоприятной температуры 25–30°C и рН в пределах 3,8–4,2.

Для дрожжевания хорошо подходят кормовые смеси, приготовленные из отходов зернового производства, корнеплодов, жома, к которым примешивают грубые корма, т. е. смеси богатые углеводами и бедные протеином (исключить корма животного происхождения, на которых развиваются гнилостные, маслянокислые и другие нежелательные микроорганизмы).

Необходимо подобрать сухое и светлое помещение, чтобы предотвратить загрязнение дрожжеванного корма спорами плесневых грибов, среди которых могут быть возбудители микотоксикозов.

Существует три способа дрожжевания кормов: безопасный, опарный и заквасочный.

Безопасный способ характеризуется тем, что 1% разведенных дрожжей вносят сразу во всю массу корма. Смесь перемешивают каждые 30 мин в течение 8–10 ч, затем корм готов к скармливанию.

При **опарном способе** вначале готовят опару: для этого дрожжи (1% от массы корма) разводят и смешивают с 1/5 корма, выдерживают 6 ч при перемешивании. Затем в опару добавляют остальной корм, двойное количество воды, и процесс дрожжевания идет еще 3 ч при постоянном перемешивании для доступа воздуха.

Заквасочный способ применяют при недостаточном количестве дрожжей, поэтому вначале готовят закваску. Для этого 0,5 кг прессованных дрожжей размножают в небольшом количестве хорошо дрожжующихся углеводистых кормов (отходы зернового производства) при 30–35°C, через 5 ч их можно использовать как закваску. Заготовленную порцию корма осолаживают, обливая их кипятком, — осолаживание происходит в течение 5 ч при температуре не ниже 60°C. К осоложенному корму добавляют такое же количество воды и половину закваски, перемешивают и оставляют на 6 ч в теплом месте, после чего корм готов к скармливанию. Вторую часть оставшейся закваски можно использовать 5–10 раз для дрожжевания новых партий корма, после чего она теряет активность.

Дрожжевание кормов улучшает качество корма и обогащает корм витаминами, а присутствие молочной кислоты увеличивает у животных аппетит.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие требования предъявляются к мясу для выработки мясных консервов?
2. На что указывает наличие в готовых консервах вегетативных клеток бактерий?
3. Каковы особенности бактериологического исследования консервов?

4. Как готовят консервные банки к бактериологическому исследованию?
5. Какие требования предъявляются при определении промышленной стерильности консервов?
6. Какие признаки роста бактерий появляются в питательных средах при наличии возбудителя порчи в исследуемом продукте?
7. Как можно выявить ботулинический токсин в консервах?
8. В чем состоят особенности отбора проб колбасы для бактериологического исследования?
9. Назовите источники микробного обсеменения колбасы в процессе приготовления.
10. С какой целью проводят индикацию БГКП в исследуемой колбасе?
11. О чем свидетельствует наличие протей в исследуемой колбасе?
12. Каковы правила отбора проб яиц для бактериологического исследования?
13. Назовите источники эндогенного и экзогенного загрязнения яиц.
14. Перечислите виды бактерий, которые определяют при бактериологическом исследовании яиц?
15. В какой массе продукта определяют наличие сальмонелл?
16. Назовите меры, которые принимают при несоответствии качества яиц и яйцепродуктов по микробиологическим показателям.
17. Почему возникла необходимость в определении количества бактерий в молоке косвенным путем?
18. Каким методом определяют количество МАФАМ в 1 мл молока?
19. Какие показатели изучают при определении сорта молока?
20. В чем преимущество редуктазной пробы при определении сорта молока?
21. На чем основано определение наличия ингибиторов в молоке?
22. Что является общим признаком всех кисломолочных продуктов?
23. В каких кисломолочных продуктах происходит одновременно молочнокислое и спиртовое брожение?
24. Какими свойствами отличаются ацидофильные молочнокислые бактерии?
25. Из какого молока готовят кумыс, чем оно отличается от коровьего?
26. Перечислите источники молочнокислых стрептококков, попавших в молоко.
27. Какова роль представителей эпифитной микрофлоры растений в процессе хранения?
28. На знании каких физиологических процессов основано приготовление и хранение сена?
29. Чем обусловлена возможность длительного хранения сенажа?
30. Какими свойствами обладает молочная кислота, образующаяся в процессе силосования?
31. Чем обогащается корм в процессе дрожжевания?

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Абортивный (лат. abortio — рожать преждевременно) — приостанавливающий развитие какого-либо процесса; недоразвившийся.

Авидность (лат. avidus — жадный, алчный) — степень аффинитета, характеризующая интенсивность, полноту и прочность соединения антигенов и антител.

Авирулентный, невирулентный (греч. а — отрицание, отсутствие; лат. virulentus — ядовитый) — отсутствие у возбудителя болезни способности вызывать инфекционный процесс в макроорганизме. См. *Вирулентность*.

Агаммаглобулинемия — отсутствие или уменьшенное содержание гамма-глобулиновых фракций белков в сыворотке крови.

Агар (малайское желе) — продукт, получаемый из морских водорослей (красных, бурых), дающий в водных растворах стойкий гель. А. — полисахарид, растворяется в воде при 80–86°C и при охлаждении образует гель. Используют в качестве ингредиента полужидких и плотных питательных и дифференциально-диагностических сред в микробиологии. В качестве адьюванта А. повышает иммунизирующую активность вакцин.

Агар мясопептонный (МПА) — плотная или полужидкая питательная среда для культивирования микроорганизмов. Для получения МПА к мясной воде добавляют 1% пептона и, 0,5% хлорида натрия, кипятят 30 мин до полного осаждения белков, вносят 0,5–2% агар-агара и кипятят до полного растворения агара, доводят рН среды до нужного значения, при необходимости осветляют (один яичный белок или 10 мл сыворотки крови на 1 л среды), затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в соответствующую посуду и стерилизуют 20–30 мин при 120°C. МПА — основная среда в лабораторной практике — применяется в виде простого агара или сложных дифференциально-диагностических сред после добавления дополнительных веществ (например, углеводов) или индикаторов.

Агглютинация (лат. agglutinare — склеивать) — склеивание и выпадение в осадок взвешенных клеток, обладающих агглютинабельными свойствами (бактерии, форменные элементы крови и др.), содержащихся в различных жидкостях тела, в результате склеивания их с антителами. А. специфична и широко применяется в иммунодиагностике инфекционных болезней.

Агглютинины — антитела, образующиеся в организме к определенным антигенам (агглютиногенам) и вступающие в реакцию с ними.

- Агглютинирующая сыворотка** — склеивающая иммунная сыворотка, содержит антитела — антиагглютинины, способные склеивать корпускулярные вещества (микробы, крупные вирусы), носящие специфические антигены. А. с. получают от животных, иммунизированных против определенных инфекционных болезней. Применяют А. с. для лабораторной идентификации микробов, а также в иммунотерапии и пассивной иммунопрофилактике при инфекционных болезнях. См. *Иммунная сыворотка*.
- Агглютиногены** — антигены, индуцирующие в организме синтез агглютининов и вступающие в реакцию с ними.
- Агрессины** (лат. *aggredior* — нападать) — продукты жизнедеятельности патогенных микробов, ослабляющие защитные силы (фагоцитоз и бактериолиз) организма. А. способствуют размножению возбудителей инфекции.
- Антигены бактерий** — сложный комплекс антигенов, состоящих из высокомолекулярных соединений белковой природы, биологических активных специфических полисахаридов и других химических соединений. У подвижных бактерий различают Н-антигены (жгутиковые) — термолабильные, протейновые, разрушающиеся при 56–80°C; О-антигены (соматические) — термостабильные, липопротеидные, выдерживающие нагревание до 80–100°C и К-антигены, или капсульные антигены, содержащиеся в клеточной стенке или капсуле. К-антигены подразделяют на термолабильные (L, В) и термостабильные (А, М). Из вирулентных штаммов сальмонелл выделен относительно термостабильный полисахаридный антиген, названный Vi-антигеном. Ряд бактерий продуцирует во внешнюю среду экзотоксины, по антигенной структуре которых возбудителей делят на серовары или серогруппы. Например, *Cl. perfringens*, типы А, В, С, D, Е, F и др. У бактерий обнаружены и так называемые протективные антигены. См. *Агглютинация*.
- Антигены гетерогенные (гетерологичные)** — антигены, содержащие общие для представителей разных видов антигенные детерминанты. Например, антиген Форсмана, присутствует в эритроцитах овец, лошадей, собак, кошек, мышей и кур.
- Антигены неполноценные (гаптены)** — низкомолекулярные вещества, которые могут реагировать с антителами, но самостоятельно не способны индуцировать их синтез. Однако при соединении их с другими, более крупными молекулами, так называемыми *carrier* (от *англ.* носитель), они приобретают антигенность. При введении таких соединений (*haptен-carrier*) в организм синтезируются антитела как против гаптена, так и против носителя. Протеины с меньшей молекулярной массой могут стимулировать выработку антител при их введении со стимуляторами типа адьюванта Фрейнда. К гаптенам относятся, например, липиды, рибонуклеаза, инсулин и др. См. *Адьюванты*.
- Антигены экзопродуктов** — метаболиты бактериальной клетки белковой природы. Наиболее изучены экзотоксины. Антигенные свойства их характеризуются высокой специфичностью и сохраняются после обработки формальдегидом в невысоких концентрациях. Например, *Cl. perfringens*. См. *Антигены бактерий*.
- Антисептика** (греч. *anti* — против; *sepsis* — гниение) — совокупность методов и приемов борьбы с патогенными микроорганизмами, внедрившимися в раны, ткани и полости организма.
- Антисыворотка** — сыворотка, содержащая специфические антитела против определенного антигена. Антитела синтезируются в результате переболевания заразной болезнью, вакцинации или гипериммунизации. См. *Гипериммунизация*.
- Антитела (иммунные тела, иммуноглобулины)** — глобулины, синтезируемые в лимфоидной ткани плазматическими клетками после введения антигена в организм. А. обладают строгой специфичностью, то есть вступают

в реакцию только с антигеном, индуцирующим их синтез. На специфике реакции «антиген — антитело» основана иммунодиагностика. Установление антител в сыворотке крови указывает на контакт данного организма с определенными возбудителями. А. обнаруживают только в глобулиновой фракции белков сыворотки крови. Различают А. с физико-химическими и иммунологическими свойствами.

Антитоксины (греч. *anti* — против; *toxikon* — яд) — антитела, образующиеся при попадании в организм токсинов, обладающих антигенными свойствами. А. нейтрализуют специфические анатоксины; применяют для лечения и профилактики болезней, возбудители которых продуцируют экзотоксины (столбняк, ботулизм и др.).

Антитела авидные — иммуноглобулины, образовавшиеся при повторном контакте организма с одним и тем же антигеном (повторная иммунизация). А. а. характеризуются пониженной авидностью. Они могут дать перекрестные реакции по антигенной структуре с родственными антигенами.

Антитела гуморальные — антитела, находящиеся в сыворотке крови. Определение А. г. в сыворотке крови служит одним из основных методов лабораторной диагностики инфекционных болезней.

Антитела моноклональные — антитела, синтезируемые плазматическими клетками единого клеточного клона β -лимфоцита, окончательными звеньями дифференциации которого они являются. См. *Моноклональные антитела*.

Асептика (греч. *a* — приставка, означающая отрицание, *sepsis* — гниение) — система мероприятий, направленных на обеспечение работы в стерильных условиях, предупреждающих внедрение патогенных микроорганизмов в раны и полости исследуемого организма (объекта).

Аттенуация (лат. *attenuare* — утончать, ослаблять) — искусственное стойкое ослабление, уменьшение вирулентности возбудителей инфекционных болезней. Широко применяют при изготовлении вакцин. Осуществляется адаптацией возбудителя к организму невосприимчивых животных, путем приспособления микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды, воздействиям бактериофага, антибиотиков, лучистой энергии.

Бактериостатические средства — лекарства, останавливающие или замедляющие размножение бактерий: сульфаниламидные препараты, антибиотики, химиотерапевтические средства.

Бактерицидный (греч. *bacterion* — палочка; лат. *caedere* — бить, поражать, убивать) — убивающий бактерий (лекарства, антибиотики и т. д.).

Бациллы — палочковидные, грамположительные аэробные микробы, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры. Большинство Б. — сапрофиты, некоторые служат возбудителями болезней, например, *Vac. anthracis*.

Биологическая проба, биопроба — метод диагностики с помощью заражения подопытных животных патологическим материалом с целью выявления и идентификации возбудителей болезней или их токсинов. Кроме того, Б. п. служит методом контроля биологических препаратов (вакцин, сывороток) на их безвредность, отсутствие токсичности, пирогенности и оценку активности.

Биотехнология — комплекс естественных или искусственно созданных технологических приемов для создания биологических систем или использования в промышленных и научных целях. Важнейшие направления Б.: энзимная, клеточная и эмбриологическая технология и автоматизированное управление вышеприведенных систем. Б. находит применение в энергетике, сельском хозяйстве, химической промышленности, медицине, ветеринарии и т. д.

Боксы бактериологические (англ. *box* — коробка, ящик) — изолированные, застекленные камеры, предназначенные для микробиологических и вирусологических исследований в асептических условиях.

- Брожение** — биологический процесс расщепления сложных органических веществ.
- Вакцина** (лат. *vaccinus* — коровий) — биологический препарат, содержащий ослабленные или убитые патогенные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, предназначенные для активной иммунизации (вакцинации) с целью создания невосприимчивости (иммунитета) организма к определенным инфекционным болезням. В. готовят как из целых микроорганизмов и вирусов, так и из их токсинов или отдельных антигенов. Различают следующие типы В.: живые, убитые, химические анавакцины, анатоксины. В зависимости от количества входящих антигенов В. подразделяют на моно-, ди- и поливакцины. В. широко применяют в профилактике и терапии инфекционных болезней. Вводят подкожно, внутримышечно, внутримышечно, аэрозольно и др.
- Вакцинопрофилактика** (лат. *vaccinum* + *prophylaxis* — предохранение) — вакцинирование с целью предупреждения (профилактики) инфекционных болезней. В. подразделяют на плановую и вынужденную. Плановую В. осуществляют с предохранительной целью в угрожаемой болезнью зоне, вынужденную В. — при возникновении болезни с целью ее ликвидации.
- Вакциотерапия** (лат. *vaccinum* + *греч. therapia* — лечение) — лечение инфекционных больных с помощью вакцин. Применяется главным образом при хроническом течении болезни (стафилококкозах, стрептококкозах) и основана на многократном, ритмическом воздействии на организм специфическим антигенным раздражителем, сопровождающемся выработкой антител и повышением общей сопротивляемости организма.
- Вирулентность** (лат. *virulentus* — ядовитый) — степень патогенности и индивидуальных способностей каждого штамма патогенного микроорганизма преодолевать естественные защитные силы макроорганизма определенного вида, проникать в него, размножаться в нем и образовывать токсины. В. обуславливает инвазивность, биологические свойства микроорганизма и резистентность макроорганизма. В. колеблется в широких пределах в зависимости от вида и возраста животных, условий их кормления и содержания. Утрату В. называют авирулентностью.
- Восприимчивость к инфекции** — способность организма отвечать на внедрение, размножение и жизнедеятельность патогенных агентов комплексом защитно-приспособительных реакций, развитием инфекции. В. — одно из проявлений реактивности организма. Зависит от вида и возраста животных, физиологического состояния организма, наличия и напряженности иммунитета, патогенности и вирулентности агента, его дозы и других факторов.
- Гемолиз** (*греч. haima* — кровь + *lysis* — распад) — процесс разрушения нормальных эритроцитов с выделением из них в окружающую среду гемоглобина. Г. наблюдается при механических, химических или серологических воздействиях. См. *Гемолизины*.
- Гемолизины** — вещества (антитела), вызывающие выделение гемоглобина из эритроцитов и гемолиз. Различают неспецифические Г. (продукты жизнедеятельности многих бактерий, вирусов, паразитов, некоторые змеиные яды, яд скорпионов) и специфические иммуногемолизины (антитела).
- Генная (генетическая) инженерия** — отрасль биологической науки, изучающая закономерности конструирования *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК и поведение их в реципиентной клетке. Цель Г. и. — создание новых генетических структур, рекомбинантных молекул. Основа Г. и. была заложена в 1972 г. в Национальной академии наук США.
- Генотип** (*греч. genos* — род; *typos* — образ, тип, отпечаток) — совокупность всех наследственных факторов организма как ядерных (геном), так и

- неядерных, внехромосомных. Г. микроорганизмов — потенциальная способность к фенотипическому выражению любого их признака. Г. — носитель наследственной информации, передаваемой из поколения в поколение.
- Гены** — фрагменты молекулы ДНК, у некоторых вирусов РНК, контролирующие синтез одного белка или пептида. В Г. записана генетич. информация обо всех признаках, присущих клетке. Г., ответственные за синтез того или иного соединения, принято обозначать строчными буквами, соответствующими названиям данного соединения. Г. исходного, или дикого, типа обозначают знаком плюс, напр. his⁺ — гистидиновый ген, leu⁺ — лейциновый ген, arg⁺ — аргининовый ген и т. д. Г. чувствительности, или резистентности, у бактерий к лекарственным препаратам, фагам и ядам обозначают буквами s (sensitive — чувствительный) и r (resistant — резистентный). Чувствительность к стрептомицину записывают str^s, а резистентность — str^r.
- Геморрагический** (греч. haimorrhagia — кровотечение) — кровотоочивый, сопровождающийся кровотечением, приводящий к кровотечению.
- Гемотоксины** — вещества микробного, растительного или животного происхождения, способные повреждать оболочку эритроцитов в циркулирующей крови и вызывать их гемолиз. К микробным Г. относят токсины стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и других бактерий.
- Генерализация** (лат. generalis — общий) — распространение патологического процесса из первичного локального (ограниченного) очага по всему организму.
- Гетеротрофы** (греч. heteros — разный, другой) — микробы, получающие углерод главным образом из готовых органических соединений в противоположность аутоотрофным. Г. — возбудители различного рода брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза, гноеродные микроорганизмы — стафилококки, диплококки и ряд других патогенных для животного организма возбудителей.
- Гипериммунизация** (греч. hyper — сверх; лат. immunis — свободный от чего-либо) — сверхиммунизация, иммунизация животных большими дозами антигена (однократно или путем повторных введений) с целью получения специфических лечебных или диагностических сывороток.
- Гифы** — ветвящиеся нити, составляющие мицелий грибов.
- Гнотобиология** (греч. gnotos — известный) — учение о гнотобиотах (см).
- Гнотобиоты (гнотобионты)** (греч. gnotos + biote — жизнь) — животные, получаемые путем гистерэктомии и выращиваемые в особых условиях, полностью свободные от микрофлоры или носители только определенных видов микроорганизмов. Широко применяются в микробиологических, иммунологических и др. исследованиях, в производстве вакцин и сывороток.
- Гомогенный** (греч. gomogenes — однородный, одного происхождения) — однородный (по структуре и составу), бесструктурный, обладающий одними и теми же свойствами, не обнаруживающий воспринимаемых глазом различий строения.
- Гомологичный (гомологический)** (греч. homologia — соответствие) — соответственный, подобный, сходный.
- Грамотрицательные бактерии** — бактерии, которые по методу Грама окрашиваются в красный цвет. Основой клеточной стенки бактерий является пептидогликан (синоним муреин), от него зависят прочность и ригидность клетки. У Г. б. пептидогликан однослойный, сравнительно тонкий. Образовавшийся комплекс — генцианфиолетовый (кристаллический фиолетовый) йод вымывается спиртом и Г. б. обесцвечиваются. При дополнительной окраске фуксином Г. б. окрашиваются в красный цвет.

- Грамположительные бактерии** — бактерии, которые по методу Грама окрашиваются в фиолетовый цвет. У Г. б. пептидогликан многослойный плотный, с ним связаны тейхоевые кислоты. Образовавшийся генцианфиолетовый йод не вымывается спиртом и Г. б. сохраняют фиолетовый цвет.
- Дезинфекция** — обеззараживание, уничтожение возбудителей инфекционных болезней (бактерий, вирусов, риккетсий и т. д.) во внешней среде путем применения физических и химических средств.
- Десенсибилизация** (*лат. sensibilisatio* — повышение чувствительности) — антианафилаксия, потеря чувствительности организма к аллергену, относительно которого он десенсибилизирован. Для Д. необходимо перед введением основной разрезающей дозы аллергена животному ввести минимальную дозу этого же аллергена. Д. имеет значение в серотерапии и профилактике, когда применяются сыворотки другого вида животного. См. *Аллергия, анафилаксия*.
- Дисбактериоз** — изменение нормальной микрофлоры животного организма, в частности в кишечнике, характеризующееся уменьшением количества или полным исчезновением типичных микробов и появлением атипичных видов бактерий, не способных выполнять функцию биологического барьера. При Д. нарушена деятельность нормальной микрофлоры кишок — ее антагонистическая активность к патогенным микроорганизмам, витаминообразующая функция, понижена резистентность организма. Возникает обычно при нерациональной антибиотикотерапии.
- Диссоциация бактерий** (*лат. dissociatio* — разъединение) — появление в популяции бактерий особей, отличающихся от исходного типа внешним видом и структурой колоний, а также наследственно закрепленными изменениями некоторых морфологических, культуральных и биологических свойств. При этом основные таксономические характеристики данного вида обычно сохраняются. Признаком Д. б., доступным наблюдению, служит изменение колоний на плотной питательной среде. При посеве чистой культуры образуются колонии двух основных типов: 1) гладкие, S-форма (*англ. smooth* — гладкий); 2) шероховатые, R-форма (*англ. rough* — шероховатый). Между этими двумя типами колоний существуют переходные, нестойкие формы. Различия между S- и R-формами не ограничиваются только структурой колоний, они охватывают и другие признаки. Различают M- (*англ. mucoid* — слизистые), D- (*англ. dragf* — карлик) и G-колонии (*англ. gonidial* — дочерний), которые образуются на поверхности или по краю нормальных колоний.
- Донор** (*лат. donare* — дарить, давать) — микроорганизм, передающий свои хромосомы (гены) другому микроорганизму и способный вызвать мутацию. Микроорганизмы, использующие в качестве источника энергии процессы окисления неорганических или органических соединений, являются донорами водорода. Понятие Д. применимо также к животным (людям), у которых берут органы (ткани) для трансплантации, кровь для приготовления сывороток и переливания с лечебной целью.
- Единица вирулентности** — величина, характеризующая степень патогенности микробов. За Е. в. принимают наименьшее количество живых микробов, вызывающих в определенный срок гибель около 80% лабораторных животных. Для более точной характеристики вирулентности бактерий определяют безусловную смертельную дозу — DcL (*dosis certe letalis*). Наиболее применима LD₅₀ (доза, убивающая половину инфицированных животных), которая обеспечивает наименьшую ошибку в оценке вирулентности патогенных бактерий. Минимальная смертельная доза D_{Lm} (*dosis letalis minima*) вызывает смерть большинства подопытных животных.
- Желатин** (*лат. gelare* — замораживать; *gelatinosus* — студенистый) — клей, продукт частичного гидролиза коллагена, содержащегося в хрящах и костях животного. Ж. применяют в фармацевтической промышленности,

гистологических исследованиях, в микробиологии для выделения чистых культур вирусов, клеток злокачественных опухолей, клеток тканей человека, растений, насекомых.

Жгутики бактерий — органоиды движения бактерий. Состоят из белковых веществ типа флагеллина, относящегося к классу сократимых белков (кератин, миозин, фибриноген). В веществе Ж. б. обнаружены лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин и др. аминокислоты. Ж. б. связаны с телом бактериальной клетки с помощью дисков: наружный находится в клеточной стенке, внутренний — в цитоплазматической мембране. По расположению жгутиков подвижные микробы подразделяют на четыре группы (см. *монотрихи*, *амфитрихи*, *лофотрихи*, *перитрихи*).

Зооантропонозы (греч. зооп — живое существо, животное и anthropos — человек; posos — болезнь) — группа заразных болезней, общих для животных и человека. З. передаются от одного вида животного к другому и от животного к человеку. Роль человека в передаче возбудителей этих болезней животным и человеку незначительна.

Зоонозы — группа болезней, свойственная только животным (например, контактиозная плевропневмония крыс, чума свиней, мыт лошадей).

Идентификация микроорганизмов — система микроскопических, культуральных, биохимических, серологических исследований и определения патогенных свойств для установления этиологического агента, определения его вида (species), подвида (subspecies), а при необходимости также серовара (varietas), его места в микробиологической (вирусологической) классификации. И. м. — заключительный этап диагностики бактериальных инфекций.

Изменчивость микроорганизмов — способность к изменениям некоторых признаков и свойств при жизни. И. м. подразделяют на ненаследственные (вызываемые неоднородностью условий и факторами окружающей среды) и наследственные (причиняемые мутациями и генетическими рекомбинациями генов).

Иммунизация (лат. immunisatio — создание невосприимчивости) — метод специфической профилактики инфекционных болезней путем создания в организме искусственного иммунитета. Различают активную и пассивную иммунизацию.

Иммунитет — способность организма защищать себя от веществ как инфекционной, так и неинфекционной природы, носящих для него чужую генетическую информацию, с целью сохранения необходимого для существования гомеостаза. Различают активный, пассивный и другие виды И.

Иммунитет антибактериальный — невосприимчивость организма к определенным бактериальным инфекциям, выработанная после переболевания, активной или пассивной иммунизации. Достигается И. а. совокупностью действия неспецифических (фагоцитоза, различных гуморальных веществ) и специфических (антител) защитных факторов организма.

Иммунная сыворотка — сыворотка, содержащая специфические антитела, полученная от иммунизированного (вакцинированного) или переболевшего животного. Применяют для лечения или профилактики (пассивная иммунизация) определенных инфекционных болезней.

Иммунодепрессия — угнетение иммунореактивности организма различными способами.

Иммунокомпетентность — иммунореактивность, способность организма ответить на введение антигена иммунной реакцией. И. связана с развитием и состоянием лимфоидной (иммунной) ткани. У плодов и новорожденных сельскохозяйственных животных лимфоидная ткань еще не дифференцирована, поэтому уровень их И. низкий.

Иммунологическая память — способность организма отвечать ускоренной и усиленной иммунной реакцией при повторном контакте с ранее введен-

ным антигеном. И. п. сохраняется в течение многих месяцев, а при воздействии некоторых антигенов — годы. Клетками И. п. служат Т- и β-лимфоциты, стимулированные данным антигеном, при этом большое значение имеют Т-лимфоциты. Клетки И. п. представляют собой часть дочерних клеток, переходящих в покоящееся состояние после двух-трех делений, стимулированных антигеном Т- и β-лимфоцитов.

Иммунологическая толерантность (лат. *tolerantia* — терпеливость, выносливость) — иммунологическая ареактивность, состояние организма, при котором не происходит иммунной ответной реакции на введение антигена.

Иммунотерапия — метод лечения инфекционных больных путем воздействия на иммунную систему организма. Применяют иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, гамма-глобулиновые препараты, вакцины. См. *Серотерапия, вакцинотерапия*.

Интерферон — продукт клеток при заражении вирусом, задерживающий развитие инфекции другими вирусами. И. по химической структуре — гликопротеид с молекулярной массой 20 000–40 000, не обладает вируцидными свойствами, нетоксичный для клеток и служит важнейшим фактором при формировании неспецифической резистентности организма в случае вирусных инфекций, вызывая интерференцию. Механизм противовирусного действия И. полностью не ясен. Чувствительность различных вирусов к интерферону неодинакова. Строгая специфичность И. новейшими исследованиями опровергнута. И. был обнаружен в 1957 г.

Инфекция (лат. *infectio* — заражение) — явление, специфической сущностью которого является внедрение и размножение инфекционного агента в макроорганизме с последующим развитием различных форм их взаимодействия — от носительства возбудителя до выраженного проявления болезни. И. процесс — комплекс реакций, возникающих в макроорганизме при инфекции и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой.

Клон — полученное бесплодным путем генетически однообразное вегетативное потомство одного вируса или одноклеточного (многоклеточного) организма. К. служит предпосылкой для определения перманентной линии (культуры) клеток. Время существования К. как совокупности наследственно-однородных клеток ограничено, так как среди родственных особей могут развиваться путем мутации клетки с новыми свойствами. См. *Штамм*.

Коли-индекс — количество особей кишечной палочки, содержащихся в 1 л (для твердых тел — в 1 кг) исследуемого субстрата. К.-и. определяют путем подсчета числа выросших колоний *E. coli* на плотной питательной среде при посеве исследуемого субстрата в разных разведениях. Он служит показателем фекального загрязнения воды, пищевых продуктов и других объектов окружающей среды. Водопроводная вода пригодна для животных и человека, если К.-и. не более 3 (коли-титр 300 и выше).

Коли-титр (франц. *titre* — надпись, статья, основание) — величина, выражающая наименьшее количество исследуемого материала в 1 мл (для твердых тел — в 1 г), в котором обнаружена одна кишечная палочка. Для определения титра кишечной палочки исследуемый субстрат раздельно в уменьшающихся объемах засевают в жидкие (реже — на плотные) среды. К.-т. используют как показатель фекального загрязнения воды, молока и других пищевых продуктов.

Колония бактериальная — изолированное скопление клеток бактерий одного вида на поверхности или внутри плотных или полужидких питательных сред в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток. Внешний вид и строение часто имеют свои особенности и могут служить ориентировочным признаком для их идентификации. К. б. бывают плоские, выпуклые, куполообразные, вдавленные; поверхность — гладкая (S-формы), шероховатая (R-формы), бугристая; края — ровные,

зазубренные, волокнистые, бахромчатые. Форма колоний также разнообразна: круглая, розеткообразная, звездчатая. По величине колонии подразделяют на крупные (4–5 мм в диаметре), средние (2–4 мм), мелкие (1–2 мм) и карликовые (меньше 1 мм). Колонии отличаются по консистенции, плотности, цвету. Они бывают прозрачные и непрозрачные, окрашенные и бесцветные, влажные, сухие и слизистые.

Комплемент (лат. complementum — дополнение) — комплекс термолabileльных белков свежей сыворотки крови животных и человека, играющий важную роль в иммунологических реакциях организма (вместе с амбоцептором третьего ряда лизирует бактерии и др. клетки). Без К. амбоцептор неактивен. См. *Антитела*.

Консерванты — вещества, используемые для предотвращения разложения органических соединений. Часто для консервации сывороток используют борную кислоту, тимол, мертиолат, фенол, азид натрия. В иммунологических исследованиях возникает необходимость консервации не только сывороток, но и антигенов, агар-агара при постановке реакции преципитации, агарозы, ионообменных смол сефадексов, а также других высокомолекулярных соединений, на которых могут расти бактерии и грибы.

Контагиозность (лат. contagiosus — заразительный) — способность болезни распространяться вследствие передачи возбудителя при непосредственном соприкосновении больных и здоровых животных или через промежуточные объекты (агенты). Наиболее контагиозными принято называть быстро и широко распространяющиеся болезни (ящур, оспа, чума свиней, грипп лошадей и др.).

Контаминация (лат. contaminatio — смещение) — обсеменение поверхности тела животного, предметов ухода, почвы, воды, кормов, биопрепаратов и других объектов патогенными микроорганизмами.

Конъюгация (лат. conjugatio — сочетание, соединение, связь, спаривание) — процесс временного объединения двух особей у одноклеточных организмов, связанный с переносом генетического материала (части генома) из одной особи в другую; эволюционный аналог полового размножения.

Конъюнктивная проба — один из методов оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа. Применяют с целью диагностирования животных, больных туберкулезом, сапом. Для этого в конъюнктивный мешок глаза закапывают с интервалом 24–48 ч несколько капель туберкулина (или маллеина). У больных животных реакция сопровождается воспалением конъюнктивы, появлением гнойных выделений. Здоровые животные не реагируют на введение аллергена или у них может наблюдаться легкое слезотечение (конъюнктивит).

Коха феномен — явление, составляющее основу туберкулиновой пробы. Кох установил, что при введении убитых туберкулезных палочек морским свинкам, больным туберкулезом, на месте инъекции возникает сильная некротическая реакция. У здоровых животных подобного явления не наблюдалось. Так был найден метод диагностики заболевания туберкулезом (реакция гиперчувствительности замедленного типа).

Культура чистая (*Монокультура*) — культура микроорганизма, содержащая особи лишь одного биологического вида.

Культура бактериальная — популяция (см.) жизнеспособных бактерий, выращенная на плотной или в жидкой питательной среде. Смешанная К. б. — смесь неоднородных микроорганизмов, выделенных из естественных субстратов (стерильных полостей и тканей организма, пищевых продуктов, воды, воздуха, почвы, из смывов с предметов и т. д.). Чистая К. б. — бактерии, выделенные из одной колонии одного вида или подвида. См. *Штамм*.

Лейкоцидин (греч. leukos + лат. caedere — бить, поражать, рубить, убивать) — токсическое вещество, продуцируемое стафилококками и стреп-

токочками и действующее токсически на лейкоциты, вызывая у них различные поражения (до полного лизиса).

Летальная (смертельная) доза, *dosis letalis* (DL) — доза микроорганизмов, вызывающая смерть у 100% экспериментально зараженных животных.

Лизис микроорганизмов — растворение микроорганизмов под влиянием специфических бактериолизатов, бактериофагов, лизоцима, антибиотиков и других средств.

Лизоцим — энзим, расщепляющий сложные полисахариды клеточной оболочки и вызывающий лизис грамположительных микроорганизмов (бактериологический энзим). Л. присутствует в белке яйца, в слизистой оболочке носовой полости и кишечника, в печени и селезенке, гранулоцитах, макрофагах, различных жидкостях организма (слезе, слюне, молоке, сыворотке крови) и других биологических продуктах.

Лофотрихи (*греч.* lophos — хохол + thrix, trichos — волос) — подвижные бактерии, у которых жгутики располагаются в виде пучка на одном конце (например, *Alcaligenes faecalis*). См. *Жгутики бактерий, монотрихи*.

Л-формы бактерий — своеобразные формы изменчивости бактерий, характеризующиеся крупными шаровидными и нитевидными плазматическими структурами. Названы в честь института Листера, где были открыты в 1935 г.

Лиофилизация — метод высушивания биологических объектов (например, вирусов, микробов) и пищевых продуктов в замороженном состоянии под вакуумом.

Лимфокины — биологические субстанции, образуемые короткоживущими тимусзависимыми лимфоцитами, макрофагами и другими клетками. К Л. относят факторы переноса и ингибирующие миграцию микрофагов, интерлейкины, интерферон и др. В комплексе с Т-клетками и другими факторами Л. осуществляют аутоиммунные реакции лимфоидной системы, реакции трансплантата против хозяина и отторжения трансплантата, а также противовирусный и противогрибковый иммунитет при взаимодействии с макрофагами индуцируют усиленную продукцию клетками перексид водорода (H_2O_2), значительно уменьшая при этом активность катализы. Интерлейкины 1 и 2 совместно с антигеном или митогеном представляют координирующие сигналы, действующие на три типа лимфоидных клеток (покоящиеся лимфоциты, хелперные Т-клетки, макрофаги), что в итоге проявляется в виде мощного пролиферативного ответа лимфоцитов. Взаимодействие Л. с клетками лимфоидной системы могут тормозить углеводы, стероидные гормоны, фармакологические препараты и их метаболиты. Продукция Л. контролируется главным комплексом гистосовместимости.

Мазки — препараты, пригоовленные из исследуемого материала (гноя, мокроты, крови и т. д.), нанесенного на предметное стекло, предназначенные для изучения под микроскопом.

Макрофаги (*греч.* macros — большой; phagos — жора) — большие фагоциты, клетки, интенсивно фагоцитирующие для организма чужеродный материал. М. подразделяют на подвижные (моноциты крови, полибласты, гистиоциты и др.) и неподвижные (ретикулярные клетки селезенки, лимфатических узлов, купферовские клетки печени, эндотелий кровеносных сосудов и др.). Особую роль играют М. в иммунном ответе. В результате внутриклеточного переваривания при фагоцитозе в кровотоки попадает значительное количество антигенных детерминант, в контакт с ними вступают лимфоциты, имеющие на поверхности комплементарные рецепторы. М. активно участвуют в синтезе антител, кооперируя с Т- и β -лимфоцитами. Они предварительно обрабатывают антиген и превращают его в более доступный для лимфоцитов.

Метаболизм (*греч.* metabole — перемена, превращение) — основной обмен веществ, совокупность химических превращений, происходящих в живом

организме, состоящих из ассимиляционной (анаболизм) и диссимиляционной (катаболизм) фаз.

Микробный пейзаж — понятие, характеризующее особенности микроорганизмов при их взаимодействии друг с другом, с окружающей средой. Исследование свойств как отдельных видов микроорганизмов, так и ассоциаций их имеет большое значение в ветеринарной микробиологии. См. *Микрофлора*.

Микроорганизмы — мельчайшие организмы, не видимые невооруженным глазом, принадлежащие к трем царствам: 1) прокариоты, *Procariotae* (бактерии, актиномицеты, порядок *Rickettsiales*, порядок *Chlamydiales* и класс *Mollicutes* (микоплазмы); 2) эукариоты, *Fucariotae* (дрожжи, микроскопические водоросли, за исключением сине-зеленых водорослей, и грибы); 3) вирусы, *Vira*. Многие виды М. патогенны для человека, животных и растений. Впервые М. были описаны в 1683 г. нидерландским биологом А. Левенгуком (1632–1723).

Микрофаги — полиморфоядерные клетки (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) крови, обладающие фагоцитарной способностью. В отличие от макрофагов М. не поглощают витальных красителей и больших корпускулярных элементов (например, мертвых клеток). Их объектами фагоцитоза чаще служат бактерии в очаге воспаления (возбудители острых инфекций). См. *Макрофаги*.

Микрофлора — микробный пейзаж, совокупность различных видов микроорганизмов, характерных для данного вида животного или растения при определенных экологических факторах; обнаруженных на поверхности или в глубине некоторого объекта окружающей среды, в полостях тела, ране и др.

Моноклональные антитела — строго специфические антитела, способные выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул. Каждое антитело является продуктом отдельного клона антителопродуцирующих клеток.

Монотрихи (греч. monos + thrix, trichos — волос) — подвижные бактерии, имеющие по одному жгутику на одном из полюсов бактериальной клетки. Монополярные М. имеют по одному жгутику на одном полюсе бактериальной клетки; монополярные политрихи — два или более жгутика на одном полюсе бактериальной клетки. См. *Лофотрихи*.

Мутагены — физические и химические факторы, вызывающие в организме стойкие наследственные изменения — мутации. См. *Мутация*.

Мутация, мутационная изменчивость (лат. mutatio — перемена, изменение) — наследуемые изменения гена или генов, контролирующих определенные наследственные признаки. М. затрагивает структуру нуклеиновых кислот. М. подразделяют по происхождению на спонтанную и индуцированную, а по направленности — на прямую и обратную. М. свойственны всем живым организмам — от вирусов до человека.

Неполные антитела — разновидность антител, способных взаимодействовать с эритроцитами, но не вызывать при этом феномен агглютинации. Были обнаружены вскоре после открытия резус-групп крови. Резус-антитела, в отличие от полных, были названы неполными, и некоторое время их свойства объясняли наличием одного активного центра, то есть считали их одновалентными. Однако эти же антитела способны вызывать гемогглютинацию, если эритроциты суспендировать в 25% -м растворе сывороточного альбумина, других белков плазмы или обрабатывать их трипсином. Эти и другие факты послужили достаточным основанием для признания неполных антител двухвалентными.

Нормальные антитела (природные антитела) — антитела, которые могут реагировать с различными антигенами (вирусами, бактериями и т. д.), хотя ранее организм не подвергался иммунизации этими антигенами.

Такие антитела получили название нормальных. Однако не исключено, что часть нормальных антител — обычные иммуногенные антитела, образовавшиеся в результате реакции на инфекционный агент, проникший в небольшой дозе и вызвавший латентное переболевание. Ландштейнер предполагает спонтанное происхождение гемагглютининов и гемолизов. В пользу этого предположения свидетельствует низкая степень специфичности Н. а. Возникновение Н. а. частично может быть обусловлено попаданием с пищей антигенов, родственных эритроцитам и бактериям. Например, антиген Форсмана, содержащийся в растительных и животных тканях, с пищей попадая в организм служит постоянным стимулом к образованию антител.

Нуклеоид — ядро прокариотов, состоящее из единственной гигантской хромосомы, не изолированной от цитоплазмы мембраной.

Нуклеотиды — составные части ДНК и РНК. Каждый нуклеотид в молекуле ДНК состоит из одного азотистого основания, пятиуглеродного углевода, дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В РНК сахар представлен рибозой, а тимин заменен урацилом.

Опсонины (греч. orpson — лакомое блюдо, приправа) — иммуноглобулины классов G и M, содержащиеся в нормальной и иммунной сыворотке крови животных и человека, облегчающие фагоцитоз бактерий и определяющие уровень сопротивляемости организма к вредным агентам. О. проявляют свое действие в присутствии комплемента, стимулируют поглощение чужеродных частиц, бактерий, вирусов и их разрушение лейкоцитами.

Паразит (греч. parasitos — нахлебник, питающийся от другого) — организм, живущий на поверхности или внутри другого организма и питающийся за его счет.

Пастеризация (от имени фр. ученого Л. Пастера) — способ обеззараживания органических жидкостей (молока, фруктов, соков и т. д.) путем нагревания их до 100°C (чаще 75–80°C) в течение 30 мин для разрушения вегетативных форм микробов с последующим охлаждением до 10°C; споры при этом не уничтожаются. Используют длительную П. (30 мин при 75–80°C), кратковременную (15–20 с при 72–75°C) и моментальную (при 85–90°C без выдержки).

Патогенность (болезнетворность) (греч. pathos — страдание, болезнь; genesis — рождение, происхождение) — способность микробов вызывать инфекционный процесс у макроорганизмов определенного вида. П. представляет сложный комплекс болезнетворных свойств микроорганизма, сформировавшийся в процессе борьбы за существование и приспособления к паразитированию в организмах растений, животных и человека. П. является видовым признаком болезнетворных микроорганизмов, которые характеризуются специфичностью действия: каждый вид способен вызывать только определенную инфекционную болезнь.

Петля бактериальная (бактериологическая петля) — инструмент для посева и пересева микроорганизмов, состоящий из платиновой проволоочной петли, укрепленной в держателе. П. б. быстро накаливается в пламени горелки (при стерилизации) и также быстро остывает, когда ее извлекают из огня.

Пиемия (греч. pyon — гной; haima — кровь) — форма сепсиса, отличающаяся от септицемии более длительным течением и гематогенным образованием вторичных очагов гнойного воспаления (метастазов) в различных органах (в частности, в печени, легких). См. *Сепсис*.

Питание микроорганизмов — усвоение питательных веществ: аминокислот, углеводов, витаминов, минеральных веществ и других соединений. Многие бактерии усваивают твердую пищу, предварительно расщепляя ее до аминокислот, глюкозы, жирных кислот, путем внешнего или внеклеточного переваривания с помощью гидролитических экзоэнзимов. Активный

транспорт метаболитов в цитоплазму осуществляют пермеазы, которые, как правило, индуцируются субстратом. Поступившие в клетку молекулы используются для анаболических и катаболических реакций. По типам питания микроорганизмы делят на аутотрофы и гетеротрофы. См. *Метаболизм*.

Плазмиды (эписомы) — внехромосомные генетические элементы бактерий, то есть физически независимые от хромосом молекулы ДНК различной молекулярной массы, не имеющие значения для роста и размножения бактериальной клетки. П. не являются обязательными генетическими структурами бактериальной клетки, необходимыми для проявления ее жизнеспособности, однако обладают способностью к автономному размножению и могут детерминировать. Например, способность к передаче генетического материала донора при конъюгации (F-плазмиды), устойчивость к антибиотикам, сульфаниламидам и другим лечебным препаратам: (R-плазмиды), синтез бактериоцина (Col-плазмиды), энтеротоксина (Ent-плазмиды), гемолизина (Hly-плазмиды) и др. У бактерий обнаружены П., не проявляющиеся фенотипически, которые получили название криптических, т. е. скрытых (*греч.* *kryptos* — скрытый, тайный). Благодаря плаздам лекарственная резистентность легко передается от одних бактерий к другим. П. бывают конъюгативные — переносят собственную ДНК от клетки донора в клетку реципиента при конъюгации и неконъюгативные — неспособные к конъюгативному переносу ДНК из одной клетки в другую. В настоящее время некоторые П. используют в качестве векторов при исследованиях в геномной инженерии, например плазмиды pBR 322, pBR 325 и др.

Плеоморфизм — существование одной популяции микробов в виде разных форм. См. *Полиморфизм*.

Полиморфизм — форма существования одного и того же образования в различных видах.

Популяция (лат. populatio — население) — совокупность особей одного вида макро- и микроорганизмов, длительно населяющих среду при определенных условиях. В естественной среде обитания микроорганизмы в большинстве случаев существуют в ассоциации различных видов, иногда симбиотически связанных между собой, иногда подавляющих развитие отдельных видов.

Постулаты Коха (лат. postulatus — требование, исходное положение) названы в честь немецкого ученого Р. Коха (1843–1910). *Триада Коха (лат. triadis — сочетание трех признаков)* — постулаты, или триады, рассматривающие условия, при которых данный микроорганизм может быть признан возбудителем болезни: обнаружен во всех случаях болезни, но не встречается у здоровых макроорганизмов и при других болезнях; выделен из организма больного в чистой культуре; при введении чистой культуры возбудителя болезни восприимчивому животному или человеку возникает болезнь или появляются специфические антитела.

Препараты биологические, биопрепараты — средства биологического происхождения, используемые для диагностики, профилактики и лечения различных болезней, стимулирования роста сельскохозяйственных животных. Диагностические П. б. — аллергены, антигены, сыворотки, бактериофаги; профилактические П. б. — вакцины, анатоксины; лечебные П. б. — специфичные гипериммунные сыворотки и гамма-глобулины; стимулирующие средства — сыворотка крови животных, СЖК, препарат АСД, препарат витамина В12 и др.

Преципитация (лат. praecipitatio — осаждение) — иммунологическая реакция, взаимодействие растворимого антигена (преципитиногена) и антитела (преципитина) в присутствии электролита (0,85% -й раствор NaCl) с образованием преципитата. В основе П. заложено физико-химическое

взаимодействие высокодисперсных коллоидов. Реакцию П. широко применяют в иммунодиагностике инфекционных болезней (сибирская язва, оспа, туляремия и др.). Она обладает высокой специфичностью и чувствительностью, позволяющей обнаружить антиген (преципитиноген) в больших разведениях.

Продромальный период — период предвестников инфекционной болезни, характеризующийся первыми, но не всегда специфическими для конкретной болезни, симптомами (температура, слабость, угнетение, отсутствие аппетита и др.).

Прокариоты (лат. pro — предшествующий; греч. каурон — ядро) — доядерные микробы, характеризующиеся отсутствием внутриплазматической сеточки организованного ядра. См. *Бактерии*.

Пропердин (лат. pro — для, на; perdere — губить, портить) — антимикробный фактор, белок нормальной сыворотки, содержащий отдельные компоненты комплемента и ионы магния. Предполагают, что П. относится к термолабильным IgM-глобулинам, но, в отличие от антител, не обладает специфичностью. Оказывает обезвреживающее действие на многие микробы и вирусы. П. обуславливает бактерицидные свойства крови.

Реакторы микробиологические (лат. re — обратно, назад; actor — погонщик, исполнитель, посредник) — аппараты для выращивания в больших количествах микробов, используемых для изготовления вакцин и анатоксинов. Применение Р. м. дает возможность в одном аппарате стерилизовать питательную среду, выращивать при нужной температуре бактерии, инактивировать вирусную культуру и расфасовывать приготовленные биопрепараты.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) — метод иммунологической диагностики вирусных и бактериальных инфекций. При этом эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антигены (антитела), приобретают способность агглютинироваться в присутствии гомологичных сывороток (антигенов). Эритроциты выполняют роль носителей антигенов со специфическими детерминантами, агглютинация которых происходит в результате реакции «антиген — антитело».

Резистентность естественная (лат. resistentia — сопротивление) — повышенная устойчивость организма к инфекции, обусловленная не активной или пассивной иммунизацией, а ее биологическими особенностями. Р. е. связана с уровнем неспецифических защитных сил организма: комплемента, лизоцима, пропердина, бактерицидной активности крови, поглонительной активности лимфоидно-макрофагальной системы. Различают абсолютную и относительную Р. е. Например, видоспецифические инфекционные болезни поражают только определенный вид животных.

Рекомбинация генетическая — перегруппировка генетического материала (ДНК), родительских генетических структур (хромосом, плазмид и др.), приводящая к появлению новых сочетаний генов у потомства. У высших организмов Р. г. связана с обменом участками гомологичных (парных) хромосом в процессе мейоза (особый тип митоза половых клеток с уменьшением числа хромосом до половины) либо с расщеплением их при гаметогенезе. Основной механизм Р. г. — кроссинговер (перекрест хромосом), т. е. происходит разрыв участков двух генетических структур, их обмен и восстановление. У микроорганизмов Р. г. осуществляется в результате обмена участками двух молекул ДНК (либо их фрагментов).

Репарация бактерий (лат. reparatio — восстановление, возмещение) — восстановление исходной структуры ДНК, поврежденной при воздействии каких-либо физических или химических факторов. Р. б. включает удаление поврежденного участка, замену его на основе комплементарной молекулы и восстановление целостности ДНК.

- Реципиент* (лат. *recipiens* — получающий, принимающий) — живой организм (человек, животное, микроб, клетка), которому вводят материал (кровь, ткань и др.), взятый от другого объекта — донора.
- Рековалесцент* (лат. *resonalescent* — выздоравливающий) — организм, находящийся в стадии выздоровления. В иммунопрофилактике и терапии инфекционных болезней Р. служит объектом для получения сыворотки, содержащей специфич. антитела. См. *Иммунотерапия*.
- Сапрориты* (греч. *sarros* — гнилой; *phyton* — растение) — растения и микроорганизмы, главным образом бактерии и грибы, питающиеся органическими веществами отмерших организмов или выделениями живых. С. относятся к гетеротрофным организмам, играют важную роль в круговороте веществ в природе. С. — непатогенные организмы, но при соответствующих условиях могут стать патогенными.
- Сенсибилизация* (лат. *sensibilis* — чувствительный) — приобретение организмом специфической повышенной чувствительности к чужеродным веществам, чаще белковой природы, аллергенам. С. могут вызвать бактерии, вирусы, сыворотки, химические вещества (многие лекарственные средства), токсины и др.
- Сепсис* (общая инфекция) (греч. *sepsis* — гниение) — состояние организма, при котором патогенные микроорганизмы, проникшие из первичного очага инфекции в кровь, размножаются в ней и заносятся во все ткани и органы, где вызывают воспалительные и дегенеративно-некротические процессы. Клиническая картина С. не зависит от вида возбудителя инфекции.
- Септикопиемия* (греч. *sepsis* — гниение; *pyon* — гной; *haima* — кровь); септицемия и пиемия — смешанная форма сепсиса, периодическое поступление в кровь микробов из первичного септического очага и образование вторичных абсцессов (очагов гнойного воспаления).
- Септицемия* — форма сепсиса, при которой наличие патогенных микроорганизмов в крови не сопровождается образованием метастических очагов гнойного воспаления. См. *Сепсис*.
- Серодиагностика* (лат. *serum* — сыворотка) — методы лабораторной иммунодиагностики, входящие в диагностический комплекс инфекционных болезней. Для С. используют различные серологические реакции. См. *Серологические реакции*.
- Серологические реакции* — методы иммунодиагностики, разработанные для обнаружения в сыворотке крови антител или антигена. С. р. специфичны и основаны на взаимодействии антигена и антитела. К С. р. относятся реакции агглютинации, связывания комплемента, преципитации, нейтрализации, гемагглютинации, а также методы определения групп крови и преципитационные пробы в судебно-ветеринарной экспертизе.
- Серопрофилактика* (пассивная иммунизация) — метод, при котором в организм для предотвращения инфекционной болезни вводят гипериммунные или рековалесцентные сыворотки, содержащие специфические антитела к антигенам возбудителей этих болезней (см. *Иммунная сыворотка*). С. дает краткосрочный ненапряженный иммунитет по сравнению с вакцинопрофилактикой, однако обеспечивает более быстрое его достижение. С. широко применяется на новорожденных сельскохозяйственных животных, у которых иммунная система еще недоразвита для обеспечения иммунологической защиты.
- Споры* (греч. *sporos* — посев, семя) — зародышевые клетки, служащие для бесполового размножения некоторых растений (грибы, водоросли) и некоторых одноклеточных организмов. С. бактерий — круглые или овальные образования, представляющие собой особую форму существования определенных видов бактерий. Служат средством сохранения вида в неблагоприятных условиях. С. отличаются наличием плотной многослой-

ной оболочки, повышенной устойчивостью к воздействию физических, химических и биологических факторов внешней среды. В автоклаве погибают при 120°C. В почве могут сохраняться десятилетиями. С. образуют в основном бактерии сем. *Bacillaceae* — бациллы и клостридии.

Среды питательные — различные искусственные среды для культивирования микробов с целью выделения возбудителя болезни из исследуемого материала и определения его вида, для накопления микробной массы при изготовлении биологических препаратов. Каждая С. п. содержит в достаточном количестве необходимые питательные вещества.

Стресс (англ. stress — напряжение) — особое состояние организма, возникающее в ответ на различные сильные воздействия окружающей среды. Понятие С. было введено канадским ученым Г. Селье в 1936 г. Он доказал, что различные сильнодействующие раздражители (инфекции, интоксикации, крайние колебания температур и прочие воздействия, вызывающие перегрузку), так называемые стрессоры, обуславливают развитие в организме стереотипных, неспецифических реакций, называемых общим, или генерализованным, адаптационным синдромом (ГАС). При ГАС характерны морфофизиологические изменения ряда систем, особенно эндокринных органов. Существует также местный адаптационный синдром (МАС), типичным проявлением которого является воспаление. С.-факторы при длительном воздействии снижают иммунологическую реактивность организма. Животные, иммунизированные в С. состоянии, не приобретают полноценного иммунитета.

Стерилизация (лат. sterilisatio — обеззараживание, обеспложивание) — 1) уничтожение микробов с помощью высокой температуры или химических веществ; 2) обеспложивание, лишение способности к оплодотворению.

Таксономия (греч. taxis — расположение в порядке, назначение, направление помос — закон) — раздел систематики, изучающий принципы, методы и правила классификации организмов, в том числе и микробов. Таксономические категории, так называемые таксоны, — соподчинение иерархическим группам объектов: вид, род, семейство, порядок, класс, отдел.

Тиндаллизация (от имени англ. физика Дж. Тиндала, 1820–1893) — метод дробной стерилизации, заключающийся в повторном воздействии на стерилизуемые объекты питательной среды относительно невысокой температуры с суточными интервалами, в течение которых объекты выдерживают при 25–37°C для проращивания спор. Т. проводят в следующих режимах: 1) трех-, четырехкратно при 100°C в течение 20–30 мин; 2) трехкратно — при 70–80°C в течение 1 ч; 3) пятикратно — при 60–65°C в течение 1 ч. Т. применяется в том случае, если стерилизуемый объект не может быть нагрет выше 100°C. Т. используют в фармацевтической промышленности для стерилизации термолabileльных растворов и в микробиологии для стерилизации некоторых питательных сред.

Токсемия (токсинемия) (греч. toxikon — яд; haima — кровь) — наличие токсинов в крови, общее болезненное состояние организма, вызванное циркуляцией в крови токсинов. Типичные симптомы Т. проявляются при ботулизме, столбняке, сальмонеллезах и др. болезнях.

Токсины — вещества бактериального, растительного или животного происхождения, вызывающие при попадании в организм человека или животного болезнь или смерть. Например, Т. ботулинический, Т. столбнячный, Т. эшерихий и др.

Толерантность иммунологическая — См. *Иммунологическая толерантность*.

Трансдукция (лат. transductio — перенесение) — процесс переноса генетических фрагментов ДНК от донорской бактериальной клетки к реципиентной, осуществляемый бактериальными вирусами (бактериофагами). Бактериям-реципиентам путем Т. могут быть переданы разнообразные

признаки доноров, особенности метаболизма, способность к сбраживанию углеводов, спорообразованию, устойчивость к токсическим антигенам, подвижность, характер поверхностных антигенов и др. Различают общую, специфическую и abortивную Т. При общей Т. передается фрагмент ДНК из любого участка хромосомы. При специфической Т. переносятся лишь определенные гены, которые обычно располагаются по хромосоме бактерии-донора рядом с интегрированным в нее профагом (неинфекционной формой фаговой ДНК). При abortивной Т. фрагмент бактериальной ДНК, захваченный фагом, проникает в реципиент и функционирует в нем, но не рекомбинирует и не реципилируется с бактериальным геном. См. *Конъюгация*.

Транскрипция (лат. transcriptio — переписывание) — процесс передачи информации от ДНК к РНК. Происходит путем синтеза цепочки РНК, имеющей последовательность нуклеотидов, комплементарную матричному участку одной из цепочек ДНК, откуда транскрибируется генетическая информация с помощью энзима РНК-полимеразы. Далее РНК переносит информацию на рибосомы, где происходит синтез соответствующих белков.

Трансляция (лат. translatio — перевод, перенесение) — перевод информации с 4-буквенного кода (по числу нуклеотидов) РНК на 20-буквенный (по числу аминокислот), осуществляемый, в процессе синтеза белка при участии РНК и рибосом.

Трансформация бактерий — преобразование, превращение, изменение морфофункциональных свойств бактерий путем передачи наследственных свойств от одних бактерий (доноров) другим (реципиентам) при помощи экстрагированной ДНК, без прямого контакта донора и реципиента и без участия бактериофага. Способность к Т. установлена у многих бактерий (пневмококков, нейссерий и др.). Явление имеет важное значение в исследованиях по генетике бактерий, инженерной генетике, молекулярной биологии, биологической технологии.

Условно-патогенные микробы — потенциально патогенные микробы, обитающие в макроорганизме как комменсалы и вызывающие инфекционный процесс лишь при ослаблении резистентности хозяина.

Фагоцитоз (от греч. phago — есть; cytos — клетка) — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных живых или убитых микробов и других чужеродных частиц с последующим перевариванием при помощи внеклеточных ферментов.

Фагоциты — клетки, с помощью которых осуществляется фагоцитоз.

Фенотип (греч. phaino — являть, показывать; typos — образ, форма, отпечаток) — совокупность признаков, структур и свойств организма, сформировавшихся в процессе его индивидуального развития и определяющих сущность данной особи.

Фимбрии, филаменты (лат. fimbriae — бахрома) — бахромки или реснички длиной 0,3–1,0 мкм, значительно короче и тоньше жгутиков, покрывающие тело микробной клетки и способствующие прикреплению микроба к поверхности субстрата. Количество Ф. у одного микроба достигает 100–400. Они не служат органами передвижения. Ф. представляют особый интерес, так как отличаются от половых ресничек, имеющих внутри канал. При конъюгации генетического материала передаются от одной особи к другой.

Флагеллин, пилин (лат. flagellum — бич, жгутик; pilus — волос) — полимерный компонент Н-антигена у жгутиковых бактерий. Ф. используют при идентификации микробов.

Фотоавтотрофы — организмы (микробы), способные ассимилировать углекислоту за счет использования солнечной энергии. См. *Фототрофы*.

Фототрофы (греч. trophe — пища, питание) — *гелиотрофы* (греч. helios — солнце) — фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие солнечную энергию.

Хемотаксис — процесс, вызываемый разницей в концентрации химических веществ в среде, где локализуются микроорганизмы.

Циля — *Нильсена метод окраски* — сложный метод окраски, применяемый для дифференцировки кислотоустойчивых микробов от кислотоподатливых, предложенный немецкими учеными Цилем и Нильсеном. Устойчивость микробов к кислотам связана с наличием в их клеточной стенке и цитоплазме жиров, липидов и восковых веществ. При окраске кислотоустойчивые микробы окрашиваются в рубиново-красный цвет, кислотоподатливые — в синий.

Цитотоксины (цитолизины) — антитела, вырабатываемые в организме при применении клеточных элементов в качестве антигенного раздражителя. Полученные Ц. действуют на клетки почек (нефротоксины), печени (гепатотоксины), селезенки, костного мозга, сердца, легких, кожи и др. При введении в организм малых доз Ц. связываются с антигенами гомологичной ткани, происходит нарушение функции соответствующего органа. Часть клеток погибает, но тут же следует подъем функциональной активности с интенсивными восстановительными процессами органа. Ц. применяют для лечения хронических воспалений, стимуляции функций различных органов, при пересадке тканей, органов и др.

Шок анафилактический — реакция сенсibilизированного организма на повторное парентеральное введение чужеродного белка. Проявляется беспокойством животного, сильной одышкой, учащением пульса, судорогами, слюнотечением, усиленным потоотделением. Возможен летальный исход.

Штамм (нем. stamm — ствол, племя, род, корень) — культура микроорганизма одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами. Культура или популяция бактерий, полученная из одной исходной микробной клетки путем прямой ее изоляции и последующего высева на питательную среду, называется клоном. Клон представляет собой генетически однородную популяцию бактерий. Ш. микроорганизмов могут отличаться друг от друга по вирулентности, чувствительности к антибиотикам, способности к токсинообразованию. Соответствующие с высокими иммуногенными свойствами Ш. применяют для изготовления вакцин.

Экология микроорганизмов (греч. oikos — жилище, местопребывание; logos — учение, слово) — наука, изучающая взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой.

Эндоспоры (греч. endon — внутри; sporos — семя, плод) — споры, образующиеся внутри микробной клетки, устойчивые к воздействию химических дезинфицирующих веществ и к высоким температурам; образуют только бактерии из сем. *Bacillaceae* (родов *Bacillus* и *Clostridium*). Другие типы спор не обладают столь высокой устойчивостью.

Эндотоксины — токсины, которые являются структурными компонентами грамотрицательных микробных клеток, поступают в окружающую среду после их гибели и разрушения, термостабильны, менее ядовиты и слабее по антигенным свойствам, чем экзотоксины. Э. тесно связаны с соматическим антигеном бактериальной клетки и представляют липополисахаридные комплексы, не инактивирующиеся формалином. Вызывают одинаковые симптомы отравления у животных через короткий срок после введения. См. *Токсины*.

Энзимы бактерий (греч. ep — в, внутри, между; zyme — закваска) — биологические катализаторы белковой природы, обладающие специфичностью и играющие важную роль в обмене веществ микроорганизмов. Различают конститутивные Э., которые постоянно находятся в клетке: основные энзимы клеточного обмена — липазы, карбогидразы, протеиназы, оксидазы и др.; индуктивные (адаптивные). У части Э. простетическая группа

непрочно связана с белковой, такие небелковые катализаторы называются коэнзимами. Разные виды микроорганизмов отличаются друг от друга по набору Э., что имеет дифференциально-диагностическое значение при их идентификации. Некоторые патогенные бактерии продуцируют особые Э. — гиалуронидазу, лецитиназу, плазмокоагулазу, фибринолизин, ДНК-азу, РНК-азу и другие, которые способствуют проявлению их патогенных свойств и рассматриваются как факторы патогенности.

Энзоотия — эпизоотологическая категория, указывающая на распространение инфекционной болезни животных в определенной местности, хозяйстве, населенном пункте.

Энтеротоксины — экзотоксины, продуцируемые токсигенными возбудителями: эшерихиями, сальмонеллами, клостридиями, стафилококками. Э. обладают энтеротропным действием, поэтому их продукция в химусе пищеварительного тракта сопровождается диареей, явлениями дегидратации и другими расстройствами. Э. устойчивы к действию пищеварительных энзимов. Вызывают пищевые токсикозы. Наиболее сильнодействующий Э. — ботулин.

Эпизоотия (греч. *epi* — на, у, среди; *zoon* — животное) — средняя степень интенсивности (напряженности) эпизоотического процесса. Характеризуется довольно широким распространением какой-либо инфекционной болезни, охватывающей хозяйство, район, область, страну. При этом заболеваемость превышает обычный для данной местности уровень. Э. свойственно нарастание числа случаев болезни (массовость заболевания) при общности источников возбудителя инфекции.

Этиология (греч. *aitia* — причина; *logos* — учение) — раздел патологии о причинах и условиях возникновения болезней. Причина является тем фактором, без которого болезнь не может возникнуть. Различают причины болезни эндогенные — внутреннего происхождения (наследственные аномалии, пороки развития, нарушения деятельности эндокринных и пищеварительных желез, нервной системы) и экзогенные — чрезвычайные или необычные для организма воздействия физических, химических, биологических факторов внешней среды. Эндогенные причины в большинстве случаев возникают под влиянием внешних раздражителей. Между болезнями существует причинно-следственная связь: одно заболевание может быть причиной другого. Специфической причиной инфекционной болезни являются патогенные микроорганизмы (бактерии, вирусы, микроскопические грибы и др.).

Эукариоты (греч. *eu* — хорошо, полностью; *карион* — ядро) — организмы (все, кроме бактерий, включая цианобактерий), обладающие, в отличие от прокариот, оформленным клеточным ядром, ограниченным от цитоплазмы ядерной оболочкой. Генетический материал заключен в хромосомах. Клетки Э. имеют митохондрии, пластиды и другие органоиды. Характерен половой процесс.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Механическая часть светового микроскопа:
 - 1) тубус;
 - 2) окуляр;
 - 3) осветительный аппарат;
 - 4) макровинт;
 - 5) предметный столик;
 - 6) микровинт;
 - 7) башмак.
2. Оптическая часть светового микроскопа:
 - 1) микровинт;
 - 2) объектив;
 - 3) «револьвер»;
 - 4) окуляр;
 - 5) конденсор.
3. Суховоздушный объектив:
 - 1) $\times 90$;
 - 2) $\times 40$;
 - 3) $\times 120$;
 - 4) $\times 8$.
4. Фронтальная линза — это линза, обращенная к глазу?
 - 1) да;
 - 2) нет.
5. Разрешающая способность микроскопа — это:
 - 1) его максимальное увеличение;
 - 2) максимальная четкость изображения;
 - 3) расстояние между двумя точками, которые не сливаются в одну;
 - 4) минимальное расстояние между двумя точками, которые воспринимаются глазом раздельно.
6. Какое устройство используют для рассмотрения под микроскопом живых бактерий?
 - 1) специальный осветитель;
 - 2) люминесцентный микроскоп;
 - 3) фазово-контрастное устройство;
 - 4) конденсор темного поля.

7. Какой микроскоп дает наибольшее увеличение?
 - 1) оптический;
 - 2) люминесцентный;
 - 3) оба утверждения неверны.
8. Какие лучи в качестве источника света используют в люминесцентном микроскопе?
 - 1) косые;
 - 2) волны дифрагированного света;
 - 3) УФЛ;
 - 4) лучи люминесценции.
9. Источник освещения в электронном микроскопе:
 - 1) электростатическое поле;
 - 2) УФЛ;
 - 3) электроны.
10. От чего зависит разрешающая способность оптического микроскопа?
 - 1) от степени увеличения окуляра;
 - 2) от степени увеличения фронтальной линзы;
 - 3) от длины волны, воспринимаемой глазом наблюдателя.
11. Зависит ли общее увеличение микроскопа от степени увеличения объектива?
 - 1) да;
 - 2) нет.
12. Установите правильную последовательность при приготовлении препаратов для микроскопии:
 - 1) изготовление мазка, фиксация, высушивание, окрашивание.
 - 2) изготовление мазка, высушивание, фиксация, окрашивание.
 - 3) изготовление мазка, фиксация, высушивание.
13. Фиксация мазков проводится с целью:
 - 1) прикрепить мазок к предметному стеклу;
 - 2) убить микробов, находящихся в патматериале;
 - 3) выявить внутреннюю структуру бактерий;
 - 4) фиксировать жгутики.
14. Определите, какие краски имеют красный цвет:
 - 1) генцианвиолет;
 - 2) фуксин;
 - 3) нейтральрот;
 - 4) кристалл виолет;
 - 5) сафранин.
15. Бактерии по-разному окрашиваются по Граму, так как:
 - 1) имеют капсулу;
 - 2) различаются по форме клеток;
 - 3) различаются по структуре клеточной стенки и химическому составу клеточной стенки;
 - 4) имеют различный химический состав цитоплазмы.
16. Клеточная стенка грамположительных бактерий в отличие от грамотрицательных содержит:
 - 1) фосфолипиды;
 - 2) пептидогликана около 70%;
 - 3) липопroteины;
 - 4) пептидогликана до 30%;

- 5) тейховые кислоты;
 - 6) рыхлую клеточную стенку.
17. Выберите правильную последовательность красок и реактивов, необходимых для окраски препаратов по Граму:
 - 1) генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, разведенный фуксин;
 - 2) разведенный фуксин, раствор Люголя, генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой;
 - 3) генцианвиолет, раствор Люголя, обесцвечивание спиртом, промывание водой, разведенный фуксин;
 - 4) обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, генцианвиолет, разведенный фуксин.
 18. По Граму грамотрицательные бактерии окрашиваются:
 - 1) в красный цвет;
 - 2) в фиолетовый цвет.
 19. Метод окрашивания кислото-щелочеустойчивых микроорганизмов:
 - 1) по Ольту;
 - 2) по Козловскому;
 - 3) по Цилю — Нильсену.
 20. Методы окрашивания капсул:
 - 1) по Граму;
 - 2) по Ольту;
 - 3) по Романовскому — Имзе;
 - 4) по Цилю — Ильсену.
 21. Методы окрашивания спор:
 - 1) по Граму;
 - 2) по Ольту;
 - 3) по Романовскому — Гимзе;
 - 4) по Златогорову;
 - 5) по Цилю — Нильсену.
 22. При приготовлении МПБ используют:
 - 1) мясной экстракт, пептон, поваренную соль;
 - 2) мясной экстракт, пептон, агар-агар;
 - 3) водопроводную воду, поваренную соль, пептон;
 - 4) мясной экстракт, пептон, соль, сыворотку крови.
 23. При приготовлении МПБ 2–3% агар-агара включают:
 - 1) для повышения питательных свойств среды;
 - 2) для создания плотной консистенции;
 - 3) для установления pH;
 - 4) для создания изотоничности.
 24. К обязательным требованиям питательных сред относятся:
 - 1) стерильность;
 - 2) определенный pH;
 - 3) наличие питательных веществ;
 - 4) наличие животных и растительных компонентов;
 - 5) прозрачность;
 - 6) все перечисленные свойства.
 25. Данные питательные среды по применению относятся к обычным:
 - 1) мясопептонный агар и мясопептонный бульон;
 - 2) МПБ и МПА с желчью, с сывороткой крови;
 - 3) среда Эндо;

- 4) среда Гисса;
 - 5) МПА с 10% поваренной соли.
26. Данные питательные среды по применению относятся к дифференциально-диагностическим:
- 1) мясопептонный агар и мясопептонный бульон;
 - 2) МПБ и МПА с желчью, с сывороткой крови;
 - 3) среда Эндо;
 - 4) среда Гисса;
 - 5) МПА с 10% поваренной соли.
27. Элективные питательные среды используют с целью:
- 1) выделения определенной группы или вида бактерий;
 - 2) накопления бактерий;
 - 3) дифференциации.
28. Для получения изолированных колоний используют питательные среды:
- 1) жидкие;
 - 2) плотные;
 - 3) сухие;
 - 4) полужидкие.
29. Для выращивания патогенных бактерий оптимальным является pH:
- 1) 7,2–7,4;
 - 2) 6,4–6,6;
 - 3) 5,0–4,2.
30. Для выращивания патогенных грибов оптимальным является pH:
- 1) 7,2–7,4;
 - 2) 6,4–6,6;
 - 3) 5,0–4,2.
31. Стерилизацией называется:
- 1) уничтожение патогенных микроорганизмов в объектах или окружающей среде;
 - 2) комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов в какой-либо объект;
 - 3) полное уничтожение на/в объекте всех жизнеспособных микроорганизмов и спор.
32. К физическим методам стерилизации относят:
- 1) гамма-лучи;
 - 2) высокую температуру;
 - 3) фильтрование через бактериальный фильтр;
 - 4) ультрафиолетовые лучи;
 - 5) дезинфекцию;
 - 6) фламбирование.
33. В сушильных шкафах сухим жаром стерилизуют:
- 1) стеклянную посуду;
 - 2) простые питательные среды;
 - 3) сыворотки;
 - 4) термостойкие порошкообразные лекарственные вещества.
34. Дробная стерилизация при температуре 56–58°C в течение 5–6 дней по часу в сутки называется:
- 1) автоклавирование;

- 2) пастеризация;
 - 3) тиндализация;
 - 4) кипячение.
35. Режим работы, применяемый для пастеризации:
- 1) 100°C — 30 мин;
 - 2) 50°C — 20 мин;
 - 3) 80°C — 10 мин;
 - 4) 80°C — 30 мин.
36. Для стерилизации питательных сред с углеводами применяют:
- 1) дробную стерилизацию текучим паром;
 - 2) кипячение;
 - 3) пастеризацию;
 - 4) автоклавирование.
37. Режим работы автоклава для стерилизации инфицированного материала:
- 1) 80°C при давлении в 1,0 атм;
 - 2) 56°C при давлении в 0,5 атм;
 - 3) 126°C при давлении в 1,5 атм.
38. Во время посева на плотные питательные среды в пробирки пробки:
- 1) кладут на стол;
 - 2) зажимают мизинцем правой руки;
 - 3) зажимают в левой руке большим пальцем.
39. После прокалывания бактериологической петли:
- 1) сразу захватывают материал;
 - 2) охлаждают петлю только о внутреннюю сторону пробирки;
 - 3) охлаждают петлю о внутреннюю сторону пробирки и прикасаются к незасеянному участку агара.
40. При посеве уколом в столбик агара пробирку держат:
- 1) вертикально дном вниз;
 - 2) под наклоном дном вверх;
 - 3) горизонтально.
41. Оптимальная температура для культивирования бактерий:
- 1) 37–38°C
 - 2) 0–10°C;
 - 3) 36,6°C;
 - 4) 25°C.
42. Оптимальная температура для культивирования грибов:
- 1) 37–38°C;
 - 2) 0–10°C;
 - 3) 36,6°C;
 - 4) 25°C.
43. Для культивирования микроорганизмов при заданной температуре используют:
- 1) автоклав;
 - 2) аппарат Коха;
 - 3) термостат;
 - 4) стерилизатор.
44. Чистая культура — это:
- 1) популяция микробов, состоящая из особей одного вида;
 - 2) культура микроорганизмов, полученная из одной особи (одноклеточная культура);

- 3) культура микроорганизмов одного вида, выделенная из определенного источника (организм животного, окружающая среда);
- 4) культура микроорганизмов одного вида, различающаяся по некоторым признакам.
45. При макроскопическом изучении колоний на жидких питательных средах учитывают:
- 1) цвет среды;
 - 2) прозрачность;
 - 3) размер колоний;
 - 4) осадок;
 - 5) наличие и характер пленки.
46. Культуральные свойства бактерий — это:
- 1) способность вызывать определенное нозологическое заболевание;
 - 2) способность ферментировать определенные химические вещества;
 - 3) характер роста на плотных и жидких питательных средах.
47. Конечные продукты протеолиза:
- 1) сахароза;
 - 2) индол;
 - 3) молоко;
 - 4) сероводород;
 - 5) нитраты;
 - 6) аммиак.
48. Индикатор, используемый для определения индола:
- 1) лакмус;
 - 2) уксусный свинец;
 - 3) щавелевая кислота.
49. Бактерии, способные вызывать образование прозрачных зон вокруг колоний при выращивании на питательной среде с добавлением 10% крови, обладают свойствами:
- 1) сахаролитическими;
 - 2) протеолитическими;
 - 3) гемолитическими;
 - 4) восстанавливающими.
50. Для выявления сахаролитических свойств культуру засевают на:
- 1) кровяной МПА;
 - 2) свернутую кровяную сыворотку;
 - 3) молоко;
 - 4) среды Гисса.
51. Для определения каталазы используют:
- 1) молоко;
 - 2) перекись водорода;
 - 3) МПЖ;
 - 4) среды Гисса.
52. Протеолитические свойства можно выявить на:
- 1) кровяном МПА;
 - 2) МПЖ;
 - 3) молоке;
 - 4) средах Гисса.

53. Наличие аммиака определяют:
- 1) полоской индикаторной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца;
 - 2) полоской индикаторной бумаги, пропитанной раствором щавелевой кислоты;
 - 3) полоской розовой лакмусной бумаги.
54. Индикатор, используемый для определения сероводорода:
- 1) раствор щавелевой кислоты;
 - 2) раствор уксуснокислого свинца;
 - 3) розовая лакмусная бумага.
55. Для определения чувствительности культуры к антибиотикам используют метод:
- 1) серийных разведений;
 - 2) «висячей» капли;
 - 3) Шукевича;
 - 4) диффузии в агар.
56. Антибиотики — это специфические продукты жизнедеятельности:
- 1) бактерий;
 - 2) грибов;
 - 3) растений;
 - 4) животных;
 - 5) человека.
57. Ингибирующее действие антибиотиков проявляется в питательных средах:
- 1) задержкой роста бактерий;
 - 2) гибелью бактерий;
 - 3) стимуляцией роста бактерий.
58. Зона задержки роста микроорганизмов до 15 мм является показателем:
- 1) достаточной чувствительности к антибиотикам;
 - 2) малой чувствительности;
 - 3) отсутствия чувствительности к антибиотикам.
59. Бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки:
- 1) перитрихи;
 - 2) лофотрихи;
 - 3) амфитрихи;
 - 4) монотрихи.
60. Для определения подвижности бактерий используют:
- 1) метод Дригальского;
 - 2) метод «раздавленной» капли;
 - 3) метод серийных разведений;
 - 4) метод тиндализации;
 - 5) метод «висячей» капли.
61. Бактерии прикрепляются к поверхности клеток при помощи:
- 1) капсулы;
 - 2) жгутиков;
 - 3) пили;
 - 4) мезосом.
62. Заражение лабораторных животных проводят с целью:
- 1) выделения чистой культуры возбудителя из исследуемого материала;

- 2) идентификации возбудителя;
 - 3) определения культуральных свойств возбудителя;
 - 4) определения биохимических свойств возбудителя.
63. Для заражения лабораторных животных не используют:
- 1) внутривенное заражение;
 - 2) интраназальное заражение;
 - 3) ректальное заражение;
 - 4) оральное заражение.
64. Грибы относятся к:
- 1) прокариотам;
 - 2) эукариотам.
65. Низшие грибы имеют мицелий:
- 1) септированный;
 - 2) несептированный.
66. Грибы, обладающие способностью к половому размножению:
- 1) специализированные;
 - 2) совершенные;
 - 3) несовершенные.
67. Микроскопию грибов проводят при помощи объектива:
- 1) $\times 100$;
 - 2) $\times 40$;
 - 3) $\times 90$.
68. Основные роды грибов:
- 1) *Aspergillus*;
 - 2) *Stachybotrys*;
 - 3) *Mycoplasma*;
 - 4) *Fusarium*.
69. Для выделения чистой культуры микроскопических грибов используются среды:
- 1) МПА;
 - 2) Китта — Тароцци;
 - 3) Сабуро;
 - 4) Чапека.
70. Для определения микробного числа воздуха используют:
- 1) МПА;
 - 2) МПБ;
 - 3) среду Сабуро;
 - 4) молочный агар.
71. По формуле Омелянского на площадь чашки с питательной средой 100 см^2 оседает столько микроорганизмов, сколько содержится в 10 л воздуха в течение:
- 1) 1 ч;
 - 2) 30 мин;
 - 3) 10 мин;
 - 4) 5 мин.
72. Допустимые санитарно-бактериологические показатели для воздуха животноводческих помещений летом:
- 1) 10 бактерий 1 м^3 ;
 - 2) 100 бактерий в 1 м^3 ;
 - 3) 500–1000 бактерий в 1 м^3 ;
 - 4) 1500–2500 бактерий в 1 м^3 .

73. Показателем загрязнения воздуха в животноводческих помещениях являются:
- 1) кишечные палочки;
 - 2) споры актиномицетов;
 - 3) стафилококки;
 - 4) дрожжеподобные грибы.
 - 5) бактерии.
74. К почвенным инфекциям относятся возбудители:
- 1) сибирской язвы;
 - 2) сальмонеллеза;
 - 3) хламидиоза;
 - 4) столбняка;
 - 5) злокачественного отека.
75. Коли-титр воды — это:
- 1) число кишечных палочек в 1 л воды;
 - 2) число кишечных палочек в 1 мл воды;
 - 3) объем, в котором обнаруживается одна кишечная палочка.
76. Методы определения коли-титра воды:
- 1) бродильных проб;
 - 2) мембранных фильтров;
 - 3) серийных разведений;
 - 4) «висячей» капли.
77. Коли-индекс воды — это:
- 1) число кишечных палочек в 1 л воды;
 - 2) объем, в котором обнаруживается одна кишечная палочка;
 - 3) число кишечных палочек в 1 мл воды.
78. При помутнении лактозопептонной среды после посева проб воды пересев делается на среду:
- 1) Китта — Тароцци;
 - 2) Чапека;
 - 3) Эндо;
 - 4) Вильсона — Блера.
79. По медицинскому ГОСТ коли-титр для водопроводной воды:
- 1) менее 100 мл;
 - 2) 1000 мл;
 - 3) не менее 333 мл.
80. Если мазок мяса окрашен удовлетворительно, видны кокки и небольшое количество палочек, то мясо считается:
- 1) свежим;
 - 2) условно годным;
 - 3) несвежим.
81. Микробное число для молока 1 класса:
- 1) менее 500 тыс.;
 - 2) 4 млн;
 - 3) 1 млн;
 - 4) 2 млн.
82. При микробиологической оценке молока используются:
- 1) редуктазная проба;
 - 2) проба с резазурином;
 - 3) метод Шукевича;
 - 4) метод серийных разведений.

83. Кислотность молока — это:
- 1) количество мл 0,1 N раствора NaOH, затраченного на нейтрализацию 10 мл молока, умноженное на 10;
 - 2) количество молока в мл, содержащее 1 кишечную палочку;
 - 3) время, в течение которого обесцвечивается 5 мл молока при добавлении капли 1% раствора метиленовой синьки.
84. Кислотность молока измеряется в:
- 1) °Д;
 - 2) °Т;
 - 3) °F;
 - 4) ангстремах.
85. Молоко считается доброкачественным, если коли-титр:
- 1) равен 0,1 мл;
 - 2) менее 0,2 мл;
 - 3) равен 0,3 мл;
 - 4) равен 1 мл.
86. Молочнокислое брожение заключается в превращении:
- 1) арабинозы в молочную кислоту;
 - 2) лактозы в молочную кислоту;
 - 3) фруктозы в молочную кислоту;
 - 4) сахарозы в глюкозу.
87. Соl-плазмида — это фактор (показатель):
- 1) резистентности организма;
 - 2) колициногенности;
 - 3) фертильности.
88. К-плазмида — это фактор:
- 1) резистентности организма;
 - 2) колициногенности;
 - 3) фертильности.
89. Трансформация у бактерий — это:
- 1) усвоение растворимой ДНК;
 - 2) половой процесс;
 - 3) перенос ДНК бактериофагом.
90. Какое из определений иммунологии верно?
- 1) наука о механизмах невосприимчивости организма;
 - 2) наука о невосприимчивости организма к микроорганизмам и способах профилактики болезней;
 - 3) наука о механизмах невосприимчивости организма к генетически чужеродным веществам и клеткам, как попавшим извне, так и собственного тела, и способах создания искусственной невосприимчивости.
91. Какое из определений иммунитета верно?
- 1) система защиты организма от микроорганизмов;
 - 2) состояние невосприимчивости организма к генетически чужеродным веществам и клеткам с целью сохранения гомеостаза;
 - 3) защита организма от генетически чужеродных веществ с целью сохранения и поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма.
92. Какие из перечисленных органов относятся к центральным органам иммунной системы?
- 1) костный мозг;

- 2) тимус;
 - 3) лимфатические узлы;
 - 4) селезенка.
93. Какие из перечисленных органов относятся к периферическим органам иммунной системы?
- 1) лимфатические узлы;
 - 2) костный мозг;
 - 3) лимфоидные структуры глоточного кольца;
 - 4) печень;
 - 5) селезенка;
 - 6) лимфатические протоки;
 - 7) все вышеперечисленные органы.
94. Какие факторы иммунитета относятся к неспецифическим?
- 1) кожа;
 - 2) слизистые оболочки;
 - 3) костный мозг;
 - 4) лихорадка;
 - 5) комплемент;
 - 6) лимфатические узлы.
95. Какое из определений антигена верно?
- 1) вещества и клетки, способные вызвать иммунитет;
 - 2) вещества и клетки, вызывающие иммунные реакции организма и формирующие иммунитет;
 - 3) генетически чужеродные вещества и клетки, которые при парентеральном введении способны вызвать иммунный ответ (сенсibilизацию, аллергию, образование антител и толерантность) и способные реагировать с образовавшимися антителами как *in vivo*, так и *in vitro*;
 - 4) генетически чужеродные вещества и клетки, которые при парентеральном введении способны вызвать иммунный ответ (сенсibilизацию, аллергию, образование антител и толерантность).
96. Что такое аллерген?
- 1) вещества, которые в организме вызывают сенсibilизацию и аллергию;
 - 2) вещества, которые чаще при повторном введении в организм вызывают повышенную реакцию клеточного и гуморального ответов;
 - 3) антигены, вызывающие аллергию.
97. Что такое конъюгированные антигены?
- 1) белки, которые приобрели новую антигенную специфичность благодаря присоединению к ним новой химической группы;
 - 2) антигены, присоединившие к себе белковые вещества бактерий;
 - 3) антигены, присоединившие к себе белковые вещества макроорганизма.
98. Что такое аутогены?
- 1) соединение белков, ферментов, лекарственных веществ экзогенного происхождения;
 - 2) АГ собственных клеток, полимерных молекул собственного индивидуума.

99. Что такое антигены экзопротеинов?
- 1) метаболиты бактериальной клетки;
 - 2) метаболиты клеток тела;
 - 3) продукты жизнедеятельности патологически измененных клеток.
100. Какая из следующих характеристик лучше всего определяет свойства гаптенов?
- 1) иммуногенны и реагируют с АТ;
 - 2) иммуногенны, но не реагируют с АТ;
 - 3) реагируют с АТ, но неиммуногенны;
 - 4) реагируют с АТ и иммуногены;
 - 5) представлены сложными макромолекулярными веществами;
 - 6) представлены простыми низкомолекулярными веществами.
101. В комплексном антигене белок-гаптен Т-клетки распознают:
- 1) носитель;
 - 2) гаптен;
 - 3) белок и гаптен;
 - 4) белок.
102. В комплексном антигене белок-гаптен β -клетки распознают:
- 1) носитель;
 - 2) гаптен;
 - 3) белок и гаптен.
103. Бактериальные липополисахариды способны вызывать:
- 1) развитие β -клеток до зрелых, продуцирующих антитела плазмочитов в присутствии Т-клеток и макрофагов;
 - 2) развитие β -клеток до зрелых, продуцирующих антитела плазмочитов в обход помощи со стороны Т-клеток;
 - 3) лишь пролиферацию β -клеток.
104. Бактерии и их токсины преимущественно инактивируются:
- 1) Т-лимфоцитами;
 - 2) β -лимфоцитами;
 - 3) натуральными киллерами.
105. МНС — это:
- 1) мембраноактивный секрет;
 - 2) главный комплекс гистосовместимости;
 - 3) местный неспецифический секрет.
106. Агрегоп — это:
- 1) синоним эпитопа;
 - 2) участки АГ, взаимодействующие с молекулой МНС;
 - 3) антигенная характеристика вариабельной, антигенсвязывающей области Ig;
 - 4) С-концевые домены антител и Т-клеточных рецепторов, не участвующие в формировании антигенсвязывающих центров.
107. Что такое гуморальный иммунный ответ?
- 1) воздействие иммунокомпетентных клеток на АГ;
 - 2) выработка интерферона лимфоцитами;
 - 3) комплекс структур и веществ, инактивирующих АГ;
 - 4) специфический иммунный ответ, обусловленный АТ.
108. Функции β -лимфоцитов:
- 1) активация плазматических клеток;

- 2) фагоцитоз;
3) синтез антител.
109. Антитела — это:
- 1) специфические глобулины, отличающиеся наличием активного центра, ответственного за соединение с антигеном;
 - 2) иммуноглобулины сыворотки крови, способные инактивировать антиген;
 - 3) иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигена, которые отличаются от других белков наличием активного центра.
110. Опсонины — это:
- 1) антитела, содержащиеся в нормальной сыворотке крови, стимулирующие фагоцитоз;
 - 2) класс антител, ответственных за сенсibilизацию Т-лимфоцитов;
 - 3) антитела неспецифической природы, подготавливающие антиген к фагоцитозу.
111. Какой из классов Ig опосредует опсонизацию?
- 1) IgG;
 - 2) IgM;
 - 3) IgA;
 - 4) IgE;
 - 5) IgD.
112. Что такое активный центр антител?
- 1) группа атомов антитела, ответственного за соединение с антигеном;
 - 2) антигенсвязывающий участок F_{ab}-фрагмента иммуноглобулина связывающий эпитопы антигена.
113. Минимальное количество активных центров, которое содержит АТ:
- 1) 0;
 - 2) 2;
 - 3) 4;
 - 4) 6;
 - 5) 5.
114. Что такое домены антител?
- 1) компактные структуры, скрепленные дисульфидной связью;
 - 2) группа атомов, отличающаяся специфичностью и ответственная за соединение с антигеном.
115. Силу химической связи одного АГ-го эпитопа с одним из активных центров АТ характеризует:
- 1) аффинность;
 - 2) авидность.
116. Силу связи цельной молекулы АТ со всеми антигенными эпитопами, которые ей удалось связать, характеризует?
- 1) аффинность;
 - 2) авидность.
117. Какой из классов Ig препятствует адгезии, адсорбции бактерий?
- 1) IgG;
 - 2) IgM;
 - 3) IgA;
 - 4) IgE;
 - 5) IgD.

118. Продукция какого класса Ig доминирует при первичном иммунном ответе?
- 1) IgG;
 - 2) IgM;
 - 3) IgA;
 - 4) IgE;
 - 5) IgD.
119. Функции белков системы комплемента:
- 1) участвуют в распознавании АГ;
 - 2) неспецифически опсонизируют АГ;
 - 3) активируют нативные Т-клетки;
 - 4) формируют поры в клеточной стенке корпускулярных АГ;
 - 5) выступают в качестве хемоаттрактантов.
120. Классический и альтернативный пути активации системы комплемента на раннем этапе:
- 1) отличаются по инициаторам процесса;
 - 2) отличаются белковыми компонентами, включающимися в реакцию;
 - 3) имеют общий инициатор процесса;
 - 4) имеют общие белковые компоненты, включающиеся в реакцию.
121. За активацию комплемента IgG и IgM отвечают:
- 1) Fab-фрагменты;
 - 2) Fc-фрагменты.
122. Презентация антигена Т-лимфоцитами — это:
- 1) соединение антигена с иммунокомпетентной клеткой, считывание клеткой генетической информации об антигене и представление ее Т-лимфоцитом;
 - 2) поглощение антигена АПК, расщепление его внутри клетки, связывание образующих антигенных пептидов с молекулами МНС и выход их на поверхность клетки для предоставления Т-лимфоцитам.
123. ДС — это:
- 1) дендритные клетки — отросчатые, ветвистые клетки, основные представители антигенпрезентирующих клеток;
 - 2) дендритное соединение — комплекс иммунокомпетентных клеток.
124. Клеточный иммунный ответ — это:
- 1) выработка интерферона лимфоцитами;
 - 2) комплекс структур и веществ, инактивирующих антиген;
 - 3) синтез антител;
 - 4) комплекс реакций иммунокомпетентных клеток, завершающийся фагоцитозом.
125. Местный иммунный ответ — это:
- 1) вещества и клетки органа и тканей, обеспечивающие резистентность к антигену;
 - 2) устойчивость тканей к проникновению в них микробов.
126. Мигрирующие из тимуса клетки, еще не вступившие в иммунологический ответ, называются:
- 1) армированные Т-клетки;
 - 2) нативные Т-клетки;
 - 3) зрелые Т-клетки.

127. Функции Т-лимфоцитов:
- 1) сохранение иммунной памяти;
 - 2) активация β -лимфоцитов;
 - 3) синтез антител;
 - 4) фагоцитоз.
128. Функции Тк-лимфоцитов:
- 1) инактивация корпускулярных антигенов;
 - 2) контактное и цитотоксическое действие на антиген;
 - 3) супрессия β -лимфоцитов.
129. Функции Т-клеток:
- 1) супрессия макрофагов;
 - 2) фагоцитоз антигена;
 - 3) продукция антител;
 - 4) иммунологическая память.
130. Функции Ts-клеток:
- 1) супрессия макрофагов, β -лимфоцитов;
 - 2) фагоцитоз антигена;
 - 3) продукция антител;
 - 4) иммунологическая память.
131. Функции Td-клеток:
- 1) супрессия макрофагов;
 - 2) стимуляция дифференцировки иммунных клеток;
 - 3) продукция антител;
 - 4) иммунологическая память.
132. Функции Th-клеток:
- 1) усиление гуморального ответа;
 - 2) супрессия макрофагов;
 - 3) фагоцитоз антигена.
133. ГНТ реализуется с помощью:
- 1) АТ;
 - 2) Т-клеток.
134. ГЗТ реализуется при участии:
- 1) АТ;
 - 2) Т-клеток.
135. В результате взаимодействия с каким классом Ig активизируются тучные клетки:
- 1) IgG;
 - 2) IgM;
 - 3) IgA;
 - 4) IgE;
 - 5) IgD.
136. Гранзимы — это:
- 1) сериновые протеазы, выделяемые Тк-, НК-клетками. Проникая в клетку, запускают ее апоптоз;
 - 2) ферменты микроорганизмов, приводящие к гибели соматические клетки;
 - 3) белки крови, действующие губительно на бактерии;
 - 4) вещества иммунокомпетентных клеток, регулирующие их взаимодействие.
137. Цитокины — это:
- 1) токсины бактерий, приводящие к гибели клетки крови;

- 2) белки клеток крови, угнетающие размножение раковых клеток;
- 3) белки активированных клеток иммунной системы, обеспечивающие межклеточное взаимодействие.
138. Интерлейкины — это:
- 1) вещества лимфоцитов, регулирующие их метаболизм;
 - 2) вещества клеток крови, регулирующие их метаболизм;
 - 3) цитокины, ответственные за межклеточные взаимодействия между лейкоцитами.
139. КСФ — это:
- 1) комплекс стимулирующих факторов;
 - 2) комплекс стимулированного фагоцитоза;
 - 3) компонент смещенного фагоцитоза;
 - 4) колониестимулирующий фактор.
140. Колониестимулирующий фактор — это:
- 1) цитокины, регулирующие деление, дифференцировку костномозговых стволовых клеток;
 - 2) интерлейкины, активирующие пролиферацию лейкоцитов;
 - 3) фактор, стимулирующий образование колоний бактериями.
141. К какому виду АГ относят бактерии?
- 1) растворимые;
 - 2) ксеноантигены;
 - 3) корпускулярные;
 - 4) аллоантигены;
 - 5) аутоантигены.
142. Как называют АТ, участвующие в обезвреживании токсинов?
- 1) нейтрализующие АТ;
 - 2) агглютинины;
 - 3) преципитины.
143. Склеивание корпускулярного АГ вызывают:
- 1) нейтрализующие АТ;
 - 2) агглютинины;
 - 3) преципитины.
144. К осадочным реакциям относят:
- 1) РА;
 - 2) РН;
 - 3) РП.
145. В специфической фазе осадочной реакции происходит:
- 1) образование комплекса АГ-АТ, невидимое невооруженным глазом;
 - 2) осаждение комплекса АГ-АТ, которое видимо невооруженным глазом.
146. Мелкокристаллический осадок в РА образуется, если в агглютинации участвует:
- 1) О-антиген бактерий;
 - 2) Н-антиген бактерий.
147. Объемным методом постановки РА называют:
- 1) тест Кумбса;
 - 2) реакцию по методу Кастеллани;
 - 3) реакцию на стекле;
 - 4) пробирочный метод;

5) кольцевую реакцию с молоком.

148. Для получения разведения сыворотки 1:25 следует смешать:

1) 1 мл испытуемой сыворотки с 1,5 мл физиологического раствора;

2) 0,1 мл испытуемой сыворотки с 2,5 мл физиологического раствора;

3) 0,1 мл испытуемой сыворотки с 2,4 мл физиологического раствора;

4) 0,1 мл испытуемой сыворотки с 2,6 мл физиологического раствора.

149. При постановке РА классическим методом в штатив ставят пять пробирок в ряд, готовят рабочее разведение каждой пробы сыворотки. В пробирки с разведенными сыворотками вносят АГ, проводят учет реакции. Какие этапы в технике постановки РА были упущены?

1) готовят основное разведение каждой испытуемой сыворотки;

2) пробирки с сыворотками до внесения АГ нагревают на водяной бане 30 мин;

3) готовят разведение контрольных — позитивной и нормальной — сывороток животных;

4) подготавливают люминисцентный микроскоп к работе;

5) после добавления к испытуемым и контрольным сывороткам АГ штативы с пробирками помещают в термостат на 16–20 ч (37–38°C), затем 1–2 ч выдерживают при комнатной температуре.

150. В пробирке визуализируется неполное просветление жидкости, хорошо выраженный агглютинат в виде раскрытого перевернутого белого кружевного зонтика. При встряхивании агглютинат разбивается на хлопья, жидкость слегка мутноватая. Как вы оцените реакцию?

1) ++++;

2) +++;

3) ++;

4) +;

5) –.

151. Титром сыворотки в РА является:

1) первое разведение сыворотки в ряду пробирок;

2) последнее разведение сыворотки в ряду пробирок;

3) последнее разведение сыворотки, в котором наблюдается агглютинация с оценками ++, +++, +++++;

4) разведение сыворотки с оценкой не менее +++++.

152. Через какой промежуток времени проводится учет ККРА?

1) 30–60 с;

2) 10–12 мин;

3) 1 ч;

4) 24 ч.

153. О положительной пробе с молоком на бруцеллез свидетельствует:

1) синяя окраска всего молока в пробирке и слегка желтоватый слой сливок;

2) синее кольцо в нижнем слое сливок, обесцвеченный столбик молока;

3) синее кольцо в верхнем слое сливок, столбик молока розовый.

154. Реакцией Кумбса выявляют наличие в сыворотке:
- 1) полных АТ;
 - 2) неполных АТ.
155. В отличие от РА в реакции Кумбса:
- 1) используют антиглобулиновую сыворотку;
 - 2) не применяют физиологический раствор;
 - 3) отсутствует визуальный эффект;
 - 4) используют эритроциты.
156. В какой реакции образование гемагглютината свидетельствует о наличии специфического АГ к АТ сыворотки?
- 1) РНГА;
 - 2) РТГА;
 - 3) РНА.
157. При приготовлении эритроцитарного диагностикума для постановки РПГА:
- 1) проводится дефибринация крови барана;
 - 2) проводится дефибринация крови морской свинки;
 - 3) эритроциты отмывают фосфатно-буферным раствором при 3–5-кратном центрифугировании;
 - 4) центрифугат разбавляют физиологическим раствором до концентрации 1:25;
 - 5) надосадочную жидкость отсасывают, эритроциты разбавляют физраствором до концентрации 1:40;
 - 6) смешивают равные объемы приготовленной взвеси эритроцитов и взвеси бактерий;
 - 7) смешивают взвесь эритроцитов и взвесь бактерий 1:2,5.
158. Эритроциты в РГА играют роль:
- 1) носителя корпускулярных АГ;
 - 2) носителя растворимых АГ;
 - 3) корпускулярных АГ, которые взаимодействуют со специфическими АТ.
159. Методом Асколи называют:
- 1) реакцию кольцепреципитации;
 - 2) кольцевую пробу с молоком;
 - 3) РДП.
160. Технику постановки реакции кольцепреципитации осуществляют:
- 1) наслаиванием АГ на сыворотку;
 - 2) наслаиванием сыворотки на АГ;
 - 3) равномерным смешиванием сыворотки и АГ;
 - 4) подслаиванием сыворотки под АГ.
161. Назовите вид АГ, участвующего в РДП:
- 1) растворимый;
 - 2) корпускулярный;
 - 3) оба вида.
162. РДП основана на:
- 1) способности к диффузии в гелях АТ;
 - 2) способности к диффузии в гелях растворимых АГ;
 - 3) способности к диффузии в гелях любых видов АГ;
 - 4) неспособности к диффузии в гелях комплекса АГ-АТ;
 - 5) способности к диффузии в гелях комплекса АГ-АТ.

163. При постановке РДП линия преципитации образовалась через 48 ч. Как вы оцените реакцию?
- 1) положительная;
 - 2) отрицательная;
 - 3) реакция подлежит перестановке.
164. При постановке РН (по Эрлиху) часть лабораторных животных после введения им смеси токсин-антитоксин остались живыми. Это свидетельствует о том, что:
- 1) антитоксин не специфичен токсину;
 - 2) произошла нейтрализация токсина;
 - 3) реакция проведена неверно.
165. Сущность РСК состоит в том, что:
- 1) взаимодействие специфического АТ и АГ происходит в присутствии комплемента;
 - 2) при взаимодействии специфического АГ и АТ происходит связывание комплемента на этом комплексе; этот процесс проявляется отсутствием гемолиза при добавлении гемолитической системы;
 - 3) при взаимодействии специфического АГ и АТ происходит связывание комплемента на этом комплексе, этот процесс проявляется наличием гемолиза при добавлении гемолитической системы.
166. Назовите лишний компонент в РСК:
- 1) АГ;
 - 2) АТ;
 - 3) комплемент;
 - 4) гемолитическая сыворотка;
 - 5) эритроциты барана;
 - 6) антиглобулиновая сыворотка;
 - 7) ни один из вышеперечисленных.
167. Бактериолитическая система РСК состоит из:
- 1) исследуемой сыворотки;
 - 2) АГ;
 - 3) комплемента;
 - 4) эритроцитов барана;
 - 5) гемолитической сыворотки.
168. В гемолитическую систему входят:
- 1) исследуемая сыворотка;
 - 2) АГ;
 - 3) комплемент;
 - 4) эритроциты барана;
 - 5) гемолитическая сыворотка.
169. Основной (диагностической) системой в РСК является:
- 1) гемолитическая система;
 - 2) бактериолитическая система.
170. Какая взвесь эритроцитов используется для РСК?
- 1) 25% -я;
 - 2) 15% -я;
 - 3) 10% -я;
 - 4) 2,5% -я;
 - 5) 1% -я.

171. Укажите, каких животных используют для получения эритроцитов для РСК:
- 1) баран;
 - 2) кролик;
 - 3) морская свинка.
172. Укажите, каких животных используют для получения гемолизина для РСК:
- 1) баран;
 - 2) кролик;
 - 3) морская свинка.
173. К главному опыту РСК относится:
- 1) приготовление взвеси эритроцитов;
 - 2) титрация гемолизина;
 - 3) титрация комплемента в гемолитической системе;
 - 4) титрация комплемента в бактериолитической системе;
 - 5) процесс приготвления и взаимодействия бактериолитической и гемолитической систем.
174. В водяную баню в РСК помещают:
- 1) бактериолитическую систему до добавления в нее гемолитической системы на 20–40 мин;
 - 2) гемолитическую систему до добавления ее в основную систему;
 - 3) бактериолитическую систему после добавления в нее гемолитической системы;
 - 4) водяную баню в РСК не применяют.
175. В каких реакциях используют флуорохромы?
- 1) ИФА;
 - 2) МФА;
 - 3) Розбенгал проба;
 - 4) кольцевая реакция с молоком.
176. Какой краситель вы отнесете к флуорохромам?
- 1) метиленовый синий;
 - 2) бенгаловый розовый;
 - 3) акридин оранжевый;
 - 4) фуксин;
 - 5) аурамин.
177. При постановке непрямого МФА используют сыворотку:
- 1) меченую (или глобулин);
 - 2) антивидовую флуоресцирующую;
 - 3) антикомплемментарную флуоресцирующую.
178. Какие из компонентов МФА относят к прямому методу?
- 1) исследуемый АГ (мазок);
 - 2) меченые специфические сыворотки (глобулин);
 - 3) немеченная специфическая сыворотка (глобулин);
 - 4) комплемент;
 - 5) меченая антикомплемментарная сыворотка.
179. ИФА основан на:
- 1) взаимодействии АГ и АТ, где в качестве метки в конъюгате (комплекс АГ–АТ с ферментом) используется фермент пероксидаза хрена;
 - 2) взаимодействии АГ и АТ и адсорбции на нем комплемента;
 - 3) свечении комплекса АГ–АТ при адсорбции на нем ферментов.

180. Назовите разновидности ИФА:
- 1) монофазный;
 - 2) гомогенный;
 - 3) полифазный;
 - 4) гетерогенный.
181. Планшет из прозрачного полистирола используют при:
- 1) гетерогенном методе постановки ИФА;
 - 2) гомогенном методе постановки ИФА.
182. Исключите лишние этапы постановки непрямого ИФА:
- 1) сенсбилизация планшета специфическим иммуноглобулином; внесение АГ;
 - 2) внесение пероксидазы антивидового конъюгата;
 - 3) добавление системы комплимента к субстратной смеси;
 - 4) внесение субстратной смеси;
 - 5) учет реакции.
183. При визуальном учете ИФА обнаружено бледно-розовое окрашивание. Как вы оцените реакцию:
- 1) ++++;
 - 2) +++;
 - 3) ++;
 - 4) +;
 - 5) -.
184. Учет ИФА проводят:
- 1) визуально;
 - 2) методом световой микроскопии;
 - 3) методом люминисцентной микроскопии;
 - 4) спектрофотометрически.
185. У каких микроорганизмов содержится хлорофилл?
- 1) бактерий;
 - 2) вирусов;
 - 3) микроскопических грибов;
 - 4) микоплазм.
186. Какой тип дыхания у микроскопических грибов?
- 1) аэробный;
 - 2) анаэробный;
 - 3) факультативный аэроб;
 - 4) факультативный анаэроб.
187. Какой тип питания у микроскопических грибов?
- 1) аутотрофы;
 - 2) микотрофы;
 - 3) метатрофы;
 - 4) паратрофы.
188. Возбудитель микозов — это:
- 1) микоплазмы;
 - 2) микроскопические грибы;
 - 3) хламидии;
 - 4) риккетсии.
189. Возбудителями микотоксикоза являются:
- 1) аспиргеллы;
 - 2) дрожжи;
 - 3) трихофитии;
 - 4) микроспории.

190. Какой микроскопический гриб не образует мицелий?
- 1) аспергиллес;
 - 2) фузариум;
 - 3) дрожжи;
 - 4) мукор.
191. Какой структурный компонент служит генератором энергии у микроскопических грибов?
- 1) гликоген;
 - 2) лизосома;
 - 3) митохондрия;
 - 4) рибосома.
192. Какую роль играет спора у микроскопических грибов?
- 1) размножения;
 - 2) дыхания;
 - 3) питания;
 - 4) защитную.
193. При какой температуре выращивают микроскопические грибы?
- 1) 37°C;
 - 2) 27°C;
 - 3) 40°C;
 - 4) 10°C.
194. Какова продолжительность культивирования микроскопических грибов?
- 1) 1 день;
 - 2) 4 дня;
 - 3) 6 дней;
 - 4) 7 дней.

ОТВЕТЫ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Таблица 24

Ответы на тестовые задания

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ответ	1, 3- 7	2, 4, 5	2, 4	2	2	3, 4	3	3	3	3	1
№ вопроса	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Ответ	2	1, 2	2, 3, 5	3	2, 5	3	2	3	2, 3	4	1
№ вопроса	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Ответ	2	1-3, 5	1	2-5	1	2	1	3	3	1-4, 6	1
№ вопроса	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Ответ	3	3, 4	1	3	2	3	2	1	4	3	1
№ вопроса	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Ответ	1, 2, 4, 5	3	2, 4, 6	3	3	4	2	2, 3	3	2	1, 4
№ вопроса	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Ответ	1-4	1	2	2	2, 5	3	1	3	2	2	2
№ вопроса	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
Ответ	2	1, 2, 4	3, 4	1	4	4	1	1, 4, 5	3	1, 2	1
№ вопроса	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
Ответ	3	3	2	1	1, 2	1	2	3	2	2	1
№ вопроса	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
Ответ	1	3	2, 3	1, 2	1, 3- 6	1, 2, 4, 5	3	2	1	2	1

№ вопроса	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Ответ	3, 6	1	2	2	3	2	2	4	3	1, 3	1, 3
№ вопроса	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
Ответ	1, 2	2	2	1	1	2	3	2	2, 4, 5	1, 2	2
№ вопроса	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Ответ	2	1	4	1	2	1, 2, 4	1, 2	4	1	2	1
№ вопроса	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
Ответ	1	2	4	1	3	3	4	1	3	1	2
№ вопроса	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
Ответ	1, 3	1	1	4	3	1, 3, 5	2	3	1	2	2
№ вопроса	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
Ответ	1, 4	1	1, 3, 5, 6	2	1	1, 4	1	1, 2, 4	3	2	2
№ вопроса	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
Ответ	6	1–3	4, 5	2	4	1	2	5	1, 3	2	3, 5
№ вопроса	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
Ответ	2, 3	1, 2	1	2, 4	1	4	3	1, 4	3	1	3
№ вопроса	188	189	190	191	192	193	194				
Ответ	2	1	3	3	1	2	4				

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бережная, Н. М.* Аллергология : словарь-справочник / Н. М. Бережная, Л. П. Бобкова, И. А. Петровская, С. И. Ялкуп. — Киев : Наукова думка, 1986.
2. *Леонов, Н. Р.* Микробиология. — М. : Колос, 2002.
3. *Беклемешев, Н. Д.* Иммунопатология и иммунорегуляция. — М. : Медицина, 1987.
4. *Блохина, И. Н.* Систематика бактерий (с основами геносистематики) : монография / И. Н. Блохина, Г. Ф. Леванова, А. С. Антонов. — Нижний Новгород : Изд-во Нижегородского ун-та, 1992.
5. *Болотников, И. А.* Физиолого-биохимические основы иммунитета сельскохозяйственных птиц / И. А. Болотников, Ю. В. Конопатов. — Л. : Наука, 1987.
6. *Болотников, И. А.* Словарь иммунологических терминов : 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Росагропромиздат, 1991.
7. *Вершигора, А. Е.* Общая иммунология. — Киев : Высшая школа, 1990.
8. Ветеринарное законодательство. — Т. 4. — М. : Агропромиздат, 1988.
9. *Воронин, Е. С.* Иммунология / Е. С. Воронин, А. М. Петров, М. М. Серых, Д. А. Девришов — М. : Колос-пресс, 2002.
10. *Госманов, Р. Г.* Основы противомикробного иммунитета / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев. — Омск : ОмГАУ, 2002.
11. *Госманов, Р. Г.* Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, А. А. Барсков. — Омск : ОмГАУ, 2008.
12. *Госманов, Р. Г.* Санитарная микробиология / Р. Г. Госманов, А. Х. Волков, А. К. Галиуллин, А. И. Ибрагимова. — СПб. ; М. ; Краснодар, 2010.
13. *Блинов, Н. П.* Химическая микробиология. — М. : Высшая школа, 1989.
14. *Захаров, И. А.* Генетическая инженерия дрожжей *in vitro* и *in vivo* / И. А. Захаров, Т. Н. Кожина // Успехи микробиологии. — 1987. — № 21.
15. *Авербах, М. М.* Иммуногенетика инфекционных заболеваний / М. М. Авербах, А. М. Мороз, А. С. Апт, Б. В. Никоненко. — М. : Медицина, 1985.
16. Иммунология / под ред. У. Пола. — М. : Мир, 1988. — Т. 1—3.
17. Иммунология. — М. : Колос, 2002.
18. *Кисленко, В. Н.* Ветеринарная микробиология и иммунология / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов — М. : ГЭОТАР-Медия, 2012. — 747 с.
19. *Колычев, Н. М.* Зоопатогенные бактерии и меры борьбы с ними : монография / Н. М. Колычев, В. Г. Ощепков. — Омск, 1998.

20. *Колычев, Н. М.* Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. — М. : Колос, 2003.
21. *Колычев, Н. М.* Краткий словарь микробиологических, вирусологических, иммунологических и эпизоотологических терминов / Н. М. Колычев, В. И. Плешакова, Р. Г. Госманов [и др.]; под общей ред. Н. М. Колычева. — Омск : ОмГАУ, 2010.
22. *Колычев, Н. М.* Краткий курс ветеринарной микробиологии. Ч. I: Общая микробиология и иммунология ; Ч. II: Частная микробиология / Н. М. Колычев, А. А. Васильев. — Омск : ОмГАУ, 1998.
23. *Колычев, Н. М.* Основы учения об инфекции и противомикробном иммунитете / Н. М. Колычев, А. А. Новицкий, Р. Г. Госманов, Т. Г. Попова — Омск : ОмГАУ, 2012.
24. *Колычев, Н. М.* Санитарная микробиология и вирусология / Н. М. Колычев, С. И. Артюхова, Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова. — Омск, 2009.
25. *Колычев, Н. М.* Руководство по микробиологии и иммунологии / Н. М. Колычев, В. Н. Кисленко, Р. Г. Госманов [и др.]. — Новосибирск : Арта, 2010.
26. *Колычев, Я. Е.* Ветеринарная иммунология. — М. : Агропромиздат, 1986.
27. *Крылов, В. Н.* Современные проблемы бактериофагии // Успехи микробиологии. — 1985. — № 20.
28. Лабораторные исследования в ветеринарии: бактериальные инфекции. — М. : Агропромиздат, 1986.
29. *Ляшко, В. А.* Механизмы активации иммунокомпетентных клеток / В. А. Ляшко и [и др.]. — М. : Медицина, 1988.
30. *Нымм, Э. М.* Словарь ветеринарных микробиологических и вирусологических терминов / Э. М. Нымм, К. А. Петерсон, Я. В. Алаотс. — М. : Росагропромиздат, 1989.
31. *Петров, Р. В.* Иммунология. — М. : Медицина, 1983.
32. *Петрович, С. В.* Микозы животных. — М. : Росагропромиздат, 1989.
33. *Петрович, С. В.* Микотоксикозы животных. — М. : Росагропромиздат, 1991.
34. *Пехов, А. П.* Плазмиды бактерий. — М. : Медицина, 1986.
35. *Поляков, А. А.* Руководство по ветеринарной санитарии / А. А. Поляков [и др.]. — М. : Агропромиздат, 1985.
36. Проблемы и перспективы современной иммунологии. — Новосибирск, 1988.
37. *Спесивцева, Н. А.* Микозы и микотоксикозы. — М. : Колос, 1964.
38. *Хазипов, Н. З.* Биотехнология в ветеринарии: учеб. пособие / Н. З. Хазипов, Р. П. Тюрикова. — Казань, 1988.
39. *Хазипов, Н. З.* Генетическая инженерия в ветеринарии: учеб. пособие / Н. З. Хазипов, Р. П. Тюрикова — Казань, 1991.
40. *Хазипов, Н. З.* Хламидиозы сельскохозяйственных животных / Н. З. Хазипов [и др.]. — М. : Колос, 1984.
41. *Харченко, С. Н.* Справочник по микозам и микотоксикозам сельскохозяйственных животных / С. Н. Харченко [и др.]. — Киев : Урожай, 1982.
42. *Хмелевский, Б.* Профилактика микотоксикозов животных / Б. Хмелевский [и др.]. — М. : Агропромиздат, 1985.
43. *Шлегель, Г.* Общая микробиология. — М. : Мир, 1987.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Основные положения микробиологии	5
Краткая история развития микробиологии	8

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1. Систематика микроорганизмов	18
Глава 2. Морфология и строение микроорганизмов	25
2.1. Морфология бактериальной клетки	25
2.2. Строение бактериальной клетки	29
2.3. Особенности морфологии и строения других групп микроорганизмов	42
2.3.1. Актиномицеты	42
2.3.2. Риккетсии	43
2.3.3. Хламидии	43
2.3.4. Микоплазмы	45
2.3.5. Микроскопические грибы	45
2.4. Тинкториальные свойства микроорганизмов	57
2.4.1. Окраска препаратов	57
Методика простой окраски фиксированного мазка ...	58
Дифференциальные методы окраски	59
Глава 3. Физиология микроорганизмов	66
3.1. Химический состав микробной клетки	66
3.1.1. Белки	66
3.1.2. Нуклеиновые кислоты	67
3.1.3. Углеводы	67
3.1.4. Липиды и липоиды	67
3.1.5. Вода	68
3.1.6. Минеральные вещества	68
3.2. Ферменты	69

3.3. Биохимические свойства микроорганизмов	73
3.3.1. Определение сахаролитических свойств	73
3.3.2. Определение протеолитических свойств	74
3.3.3. Определение редуцирующей (восстанавливающей) способности	75
3.3.4. Определение фермента каталазы	75
3.3.5. Определение плазмокоагуляции	75
3.3.6. Определение ДНК-азы	76
3.4. Метаболизм	76
3.5. Питание	76
3.5.1. Типы питания микробов	78
3.5.2. Факторы роста микробов	81
3.6. Дыхание	82
3.6.1. Биологическое окисление	85
3.6.2. Окислительно-восстановительный потенциал питательной среды	87
3.6.3. Методы создания анаэробноза	87
3.7. Рост и размножение бактерий	88
3.7.1. Фазы развития бактериальной популяции	89
3.8. Размножение грибов и дрожжей	91
3.9. Основные принципы культивирования бактерий	92
3.9.1. Особенности культивирования различных микроорганизмов	94
3.10. Синтез микробных пигментов, флуоресцирующих и ароматобразующих веществ	95
Глава 4. Генетика микроорганизмов	97
4.1. Материальные основы наследственности	97
4.1.1. Синтез белка	98
4.2. Наследственность и изменчивость	100
4.3. Генетические рекомбинации	105
4.4. Плазмиды	108
Глава 5. Влияние факторов окружающей среды на микроорганизмы	110
5.1. Физические факторы	110
5.1.1. Температура	110
5.1.2. Гидростатическое давление	113
5.1.3. Осмотическое давление среды	113
5.1.4. Различные виды излучения	114
5.1.5. Электричество	117
5.1.6. Ультразвук	117
5.1.7. Аэроионизация	117
5.2. Химические факторы	118
5.3. Биологические факторы	121
5.3.1. Антибиотики	121
5.3.2. Бактериофаги	126
Глава 6. Экология микроорганизмов	130
6.1. Микрофлора почвы, навоза	132
6.2. Микрофлора воды	134
6.3. Микрофлора воздуха	134
6.4. Микрофлора организма животных	135
6.5. Нормальная микрофлора	139

Глава 7. Роль микроорганизмов	
в круговороте веществ в природе	142
7.1. Круговорот азота	142
7.1.1. Фиксация атмосферного азота	143
7.1.2. Аммонификация белков	144
7.1.3. Аммонификация мочевины	145
7.1.4. Нитрификация	146
7.1.5. Денитрификация	146
7.2. Круговорот углерода	147
7.2.1. Роль микробов в разложении клетчатки	147
7.2.2. Спиртовое брожение	149
7.2.3. Молочнокислое брожение	149
7.2.4. Маслянокислое брожение	151
7.2.5. Уксуснокислое брожение	152
7.3. Круговорот фосфора, железа и серы	152

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ

Глава 8. Учение об инфекции	156
8.1. Типы биотических взаимоотношений микроорганизмов с макроорганизмами	156
8.2. Понятие об инфекции, инфекционном процессе и инфекционной болезни	158
8.3. Патогенность и вирулентность микроорганизмов	163
8.3.1. Основные факторы патогенности	166
8.4. Роль макроорганизма и условий окружающей среды в возникновении и развитии инфекционного процесса	171

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

Глава 9. Иммуитет. Классификация иммунитета	176
9.1. Врожденный иммунитет	177
9.2. Приобретенный иммунитет	178
9.3. Неспецифические (естественные) факторы иммунитета	182
9.3.1. Анатомо-физиологические факторы неспецифической резистентности	183
9.3.2. Гуморальные факторы неспецифической резистентности	185
9.3.3. Клеточные факторы неспецифической резистентности	190
Глава 10. Иммунная система и ее функции	193
10.1. Характеристика классов лимфоцитов	196
Глава 11. Специфические факторы иммунитета	199
11.1. Антигены	199
11.2. Формы иммунного реагирования (иммунный ответ)	204
11.3. Гуморальные факторы. Антитела (иммуноглобулины)	207

11.3.1. Структура иммуноглобулинов	209
11.3.2. Свойства антител	211
11.3.3. Моноклональные антитела	214
11.3.4. Синтез и динамика образования антител	217
11.4. Формы взаимодействия «антиген — антитело»	219
11.5. Клеточные факторы (клеточный иммунитет)	223

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Глава 12. Методы диагностики инфекционных болезней	226
12.1. Бактериологические методы диагностики инфекционных болезней	226
12.2. Микологические методы диагностики инфекционных болезней	226
12.3. Серологические (иммунологические) методы диагностики инфекционных болезней	227
12.3.1. Характеристика серологических реакций	228
12.3.2. Прямой и непрямой флуоресцентные методы	231
12.3.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)	232
12.3.4. Радиоиммунологический анализ (РИА)	233
12.4. Полимеразно-цепная реакция	234
12.5. ДНК-зонды (ДНК-гибридизации)	235
12.6. Клеточные методы диагностики инфекционных болезней. Тесты Т-системы лимфоцитов	235
12.7. Биосенсоры	238
12.8. Биочипы	239
Глава 13. Основы биотехнологии	243
13.1. Понятие о биотехнологии, ее цели и задачи	244
13.2. Принципы генетической инженерии	247
13.3. Микроорганизмы, клетки и процессы, применяемые в биотехнологии	251
13.4. Генетическая инженерия и область ее применения в биотехнологии	256
13.5. Биологические препараты	261
13.5.1. Вакцины	261
13.5.2. Иммунные сыворотки и иммуноглобулины	266
13.5.3. Диагностические антигены и аллергены	269
13.5.4. Бактериофаги-вирусы	270
13.6. Лиофилизация микроорганизмов (биологических препаратов)	271
13.7. Правила использования и хранения биопрепаратов, их транспортировка	272

РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ

ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ

Глава 14. Возбудители бактериальных инфекций	276
14.1. Грамположительные кокки	276
14.1.1. Стафилококки	276
14.1.2. Стрептококки	282

14.2.	Грамположительные палочки, не образующие споры	291
14.2.1.	Возбудитель рожи свиней	291
14.2.2.	Возбудитель листериоза	295
14.3.	Патогенные микобактерии	299
14.3.1.	Возбудитель туберкулеза	299
14.3.2.	Возбудитель паратуберкулеза	312
14.4.	Патогенные актиномицеты	317
14.5.	Грамположительные спорообразующие палочки	321
14.5.1.	Возбудитель сибирской язвы	321
14.6.	Патогенные анаэробы	332
14.6.1.	Клостридии — возбудители анаэробных инфекций	332
14.6.2.	Возбудитель столбняка	332
14.6.3.	Возбудитель ботулизма	339
14.6.4.	Возбудитель эмфизематозного карбункула	345
14.6.5.	Возбудители злокачественного отека	350
	<i>Clostridium septicum</i> (<i>Vibrio septique</i>)	351
	<i>Clostridium perfringens</i> (<i>C. welchii</i>).	353
	<i>Clostridium novyi</i> (<i>C. oedematiens</i>)	356
	<i>Clostridium histolyticum</i>	359
	<i>Clostridium sordellii</i>	360
14.6.6.	Возбудитель браздота овец	364
14.6.7.	Возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии	364
14.7.	Грамотрицательные палочки, не образующие споры	366
14.7.1.	Возбудитель некробактериоза	366
14.7.2.	Возбудитель копытной гнили	371
14.7.3.	Энтеробактерии	373
	Возбудители колибактериоза	374
	Возбудители сальмонеллезов	380
14.7.4.	Иерсинии	387
	Возбудитель антропозоонозной чумы	388
	Возбудитель казеозного лимфаденита (псевдотуберкулеза) овец	391
14.7.5.	Пастереллы	394
	Возбудители пастереллеза	394
	Возбудители гемофилезов	397
14.7.6.	Возбудители бруцеллеза	400
14.7.7.	Возбудитель туляремии	408
14.7.8.	Возбудитель сапа	414
14.7.9.	Возбудитель мелиоидоза	416
14.8.	Извитые бактерии	417
14.8.1.	Возбудитель кампилобактериоза	417
14.8.2.	Возбудитель лептоспироза	423
14.8.3.	Возбудитель дизентерии свиней	428
14.9.	Патогенные микоплазмы	430
14.9.1.	Возбудитель контактной перипневмонии крупного рогатого скота	437
14.9.2.	Возбудитель инфекционной агалактии мелкого рогатого скота	440
14.9.3.	Возбудитель респираторного микоплазмоза кур и индеек	442
14.10.	Патогенные риккетсии	445

14.10.1.	Возбудитель ку-риккетсиоза (ку-лихорадки) . . .	449
14.10.2.	Возбудитель эрлихиоза собак	453
14.10.3.	Возбудитель эрлихиоза жвачных и всеядных . . .	455
14.10.4.	Возбудитель гидроперикардита (коудриоза)	455
14.10.5.	Возбудитель неориккетсиоза собак	456
14.11.	Патогенные хламидии	457
14.11.1.	Возбудитель орнитоза	460
14.11.2.	Возбудители хламидиозов сельскохозяйственных животных	464

Глава 15. Микроскопические грибы — возбудители

	микозов и микотоксикозов	468
15.1.	Возбудители плесневых микозов	469
15.1.1.	Возбудитель мукормикоза	469
15.1.2.	Возбудители пенициллеза	471
15.1.3.	Возбудитель аспергиллеза	472
15.2.	Возбудители микозов, вызываемых дрожжеподобными грибами	474
15.2.1.	Возбудители кандидамикоза	474
15.2.2.	Возбудитель кокцидиомикоза	477
15.2.3.	Возбудитель эпизоотического лимфангоита	480
15.3.	Возбудители дерматомикозов	482
15.3.1.	Возбудители трихофитии	482
15.3.2.	Возбудители микроспории	485
15.3.3.	Возбудители фавуса (парши)	487
15.4.	Возбудители микотоксикозов	488
15.4.1.	Возбудители аспергиллотоксикозов	489
15.4.2.	Возбудители фузариотоксикоза	490
15.4.3.	Возбудитель стахиботриотоксикоза	492

РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ

САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 16. Учение о санитарно-показательных

	микроорганизмах	500
16.1.	Принципы санитарно-микробиологических исследований	503
16.2.	Методы санитарно-микробиологических исследований	506

Глава 17. Микробиологическое

	исследование воды, воздуха, почвы, навоза	508
17.1.	Санитарно-микробиологическое исследование воздуха	508
17.1.1.	Седиментационный метод Коха	509
17.1.2.	Аспирационный метод Кротова	510
17.2.	Санитарно-микробиологическое исследование почвы	511
17.2.1.	Определение МАФМ в 1 г почвы методом серийных разведений	512
17.2.2.	Определение коли-титра почвы методом бродильных проб с использованием среды Кесслера	513
17.3.	Санитарно-микробиологическое исследование воды. Определение коли-титра и коли-индекса воды	514

17.3.1. Определение количества МАФАМ в водопроводной воде	515
17.3.2. Определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ) воды	516
Метод бродильных проб	517
Метод мембранных фильтров	519
17.4. Санитарно-микробиологическое исследование навоза	521
Глава 18. Микробиологическое исследование сырья животного происхождения	526
18.1. Микрофлора кожевенно-мехового сырья	526
18.2. Консервирование кожевенного сырья	527
18.3. Микрофлора шерсти	528
18.4. Кожевенно-меховое сырье как возможный источник инфекции	529
Глава 19. Микробиологическое исследование пищевых продуктов и кормов для животных	530
19.1. Бактериологическое исследование мяса сельскохозяйственных и промысловых животных	530
19.2. Бактериологическое исследование мяса птиц	533
19.3. Бактериологическое исследование мясных консервов и сырья для изготовления колбас, фарша и других видов мясной продукции	537
19.4. Бактериологическое исследование колбасных изделий и продуктов из мяса	540
19.5. Бактериологическое исследование и оценка качества яиц и яичных продуктов	541
19.6. Санитарно-микробиологическое исследование молока	545
19.6.1. Кислотность молока	546
19.6.2. Степень чистоты	547
19.6.3. Проба на редуктазу	547
19.7. Изучение микрофлоры кисломолочных продуктов	550
19.7.1. Технология производства кисломолочных продуктов	550
19.7.2. Продукты молочнокислого брожения	551
19.7.3. Продукты комбинированного брожения	552
19.8. Бактериологическая оценка качества свежей рыбы и морепродуктов	554
19.9. Микрофлора меда и продукции пчеловодства	556
19.10. Микробиология зерна, муки и хлебных продуктов	557
19.11. Санитарно-микробиологическое исследование кормов	560
19.11.1. Сено	561
19.11.2. Сенаж	563
19.11.3. Микробиология силосования кормов	565
19.11.4. Дрожжевание кормов	569
Термины и определения	572
Тестовые задания	591
Ответы к тестовым заданиям	613
Литература	615

*Николай МАТВЕЕВИЧ КОЛЫЧЕВ,
Рауис Госманович ГОСМАНОВ*

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ

УЧЕБНИК

Зав. редакцией ветеринарной и сельскохозяйственной
литературы *И. О. Туренко*
Ответственный редактор *Н. А. Сметанина*
Редактор *Е. А. Монахова*
Технический редактор *Е. С. Крюков*
Корректор *Т. В. Ананченко*
Подготовка иллюстраций *А. П. Маркова*
Верстка *М. И. Хетерели*
Выпускающие *Е. П. Королькова, Н. В. Черезова*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.
Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

**ГДЕ КУПИТЬ
ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ:**

*Для того чтобы заказать необходимые Вам книги, достаточно обратиться
в любую из торговых компаний Издательского Дома «ЛАНЬ»:*

по России и зарубежью
«ЛАНЬ-ТРЕЙД». 192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13
тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82; тел./факс: (812) 412-54-93
e-mail: trade@lanbook.ru; ICQ: 446-869-967
www.lanpbl.spb.ru/price.htm

в Москве и в Московской области
«ЛАНЬ-ПРЕСС». 109263, Москва, 7-я ул. Текстильщиков, д. 6/19
тел.: (499) 178-65-85; e-mail: lanpress@lanbook.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае
«ЛАНЬ-ЮГ». 350072, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1
тел.: (861) 274-10-35; e-mail: lankrd98@mail.ru

ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:

интернет-магазины:

Издательство «Лань»: <http://www.lanbook.com>
«Сова»: <http://www.symplex.ru>; «Ozon.ru»: <http://www.ozon.ru>
«Библион»: <http://www.biblion.ru>

Подписано в печать 18.09.13.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108^{1/32}.
Печать офсетная. Усл. п. л. 32,76. Тираж 1000 экз.

Заказ № _____

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленных диапозитивов
в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 32.
Тел./факс (8182) 64-14-54; www.ippps.ru

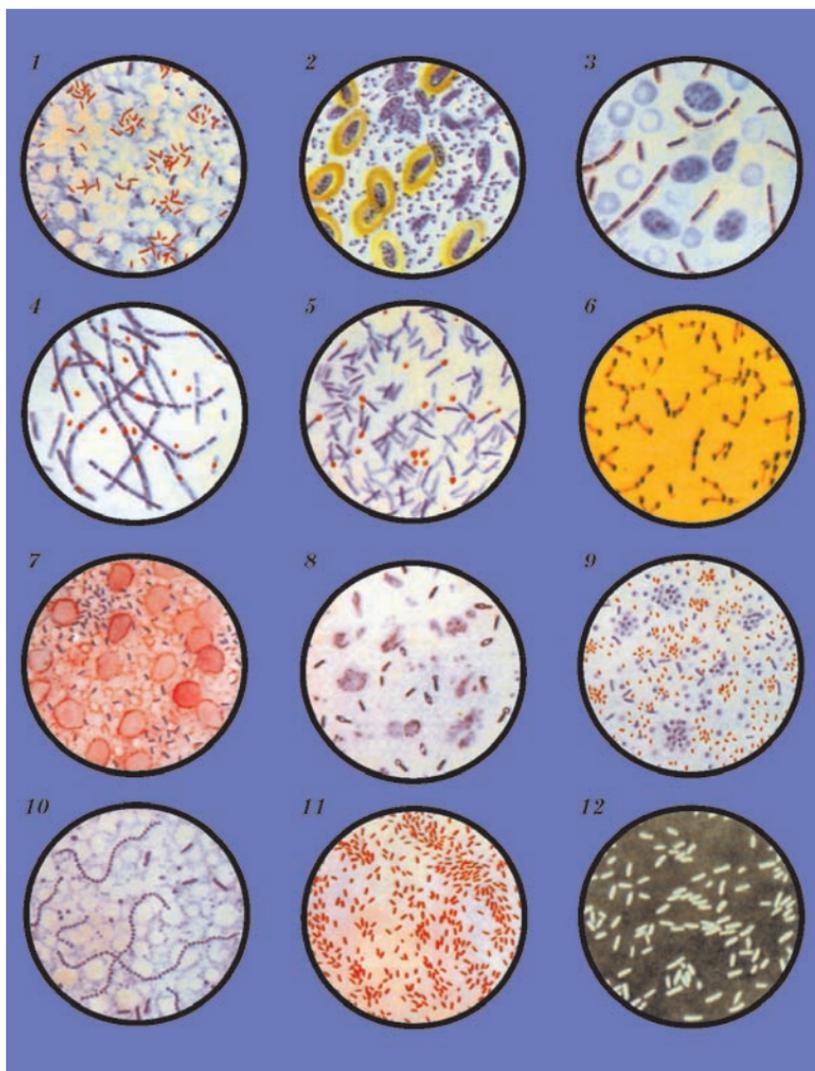


Рис. 1

Микроорганизмы, окрашенные различными методами:

1 — туберкулезные бактерии в молоке (окраска по Цилю — Нельсену); 2 — пастереллы в крови птиц (окраска по Романовскому — Гимзе); 3 — капсулы сибиреязвенных бацилл (окраска по Михину); 4 — споры сибиреязвенных бацилл (окраска по Ожешко); 5 — споры столбнячных бацилл в культуре (окраска по Мюллеру); 6 — зерна волютина в дифтерийных коринебактериях (окраска по Нейссеру); 7 — бактерии рожи свиней в печени (окраска по Граму); 8 — *Clostridium chauvoei* в мазке из некротической мышцы (окраска генцианвиолетом); 9 — бруцеллы в смешанной культуре (окраска по Шуляку и Шину); 10 — агалактийный стрептококк в молоке (окраска метиленовой синью Лёфлера); 11 — кишечная палочка в мазке из агаровой культуры (окраска по Граму); 12 — азотобактерии (негативная окраска по Дорнеру).

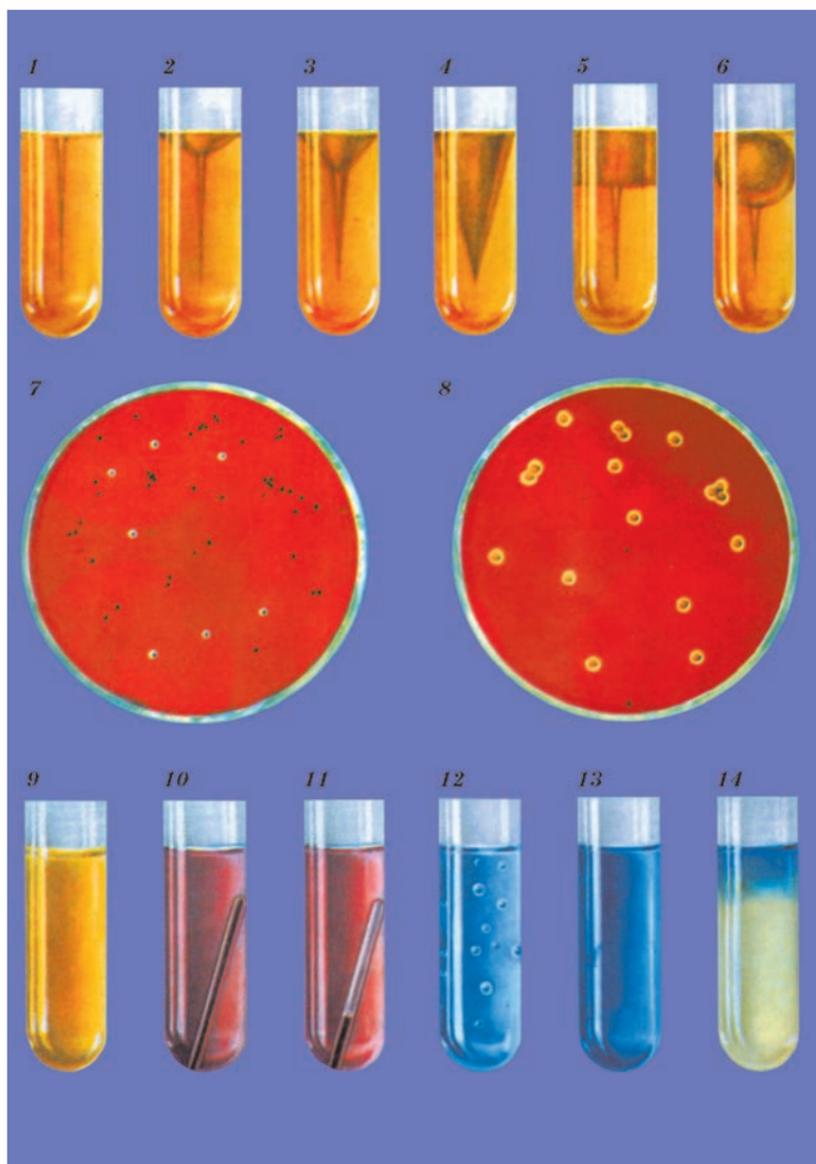


Рис. II
Дифференциально-диагностические среды:

1-6 — формы расщепления желатины; 7 — кровяная среда с теллуридом калия; 8 — зона гемолиза вокруг колоний на кровяном агаре; 9-11 — жидкая среда с углеводом и индикатором Андраде (9 — отсутствие ферментации; 10 — ферментация с образованием кислоты; 11 — ферментация с образованием кислоты и газа); 12 — ферментация с образованием кислоты и газа на полужидкой среде с углеводом и индикатором ВР; 13, 14 — молоко с метиловым синим (13 — отсутствие редукции; 14 — редукция).



Рис. III
Туберкулез:

1 — туберкулезные микробы под микроскопом (окраска по Цилю — Нельсену); 2 — рост туберкулезных культур на среде Петраньяни (а — тип *bovinus*, б — тип *humanus*, в — *avium*); 3 — положительная реакция на туберкулин (а и б — глазная и внутрикожная у коровы, в и г — внутрикожная у курицы и свиньи, д — глазная у лисицы).

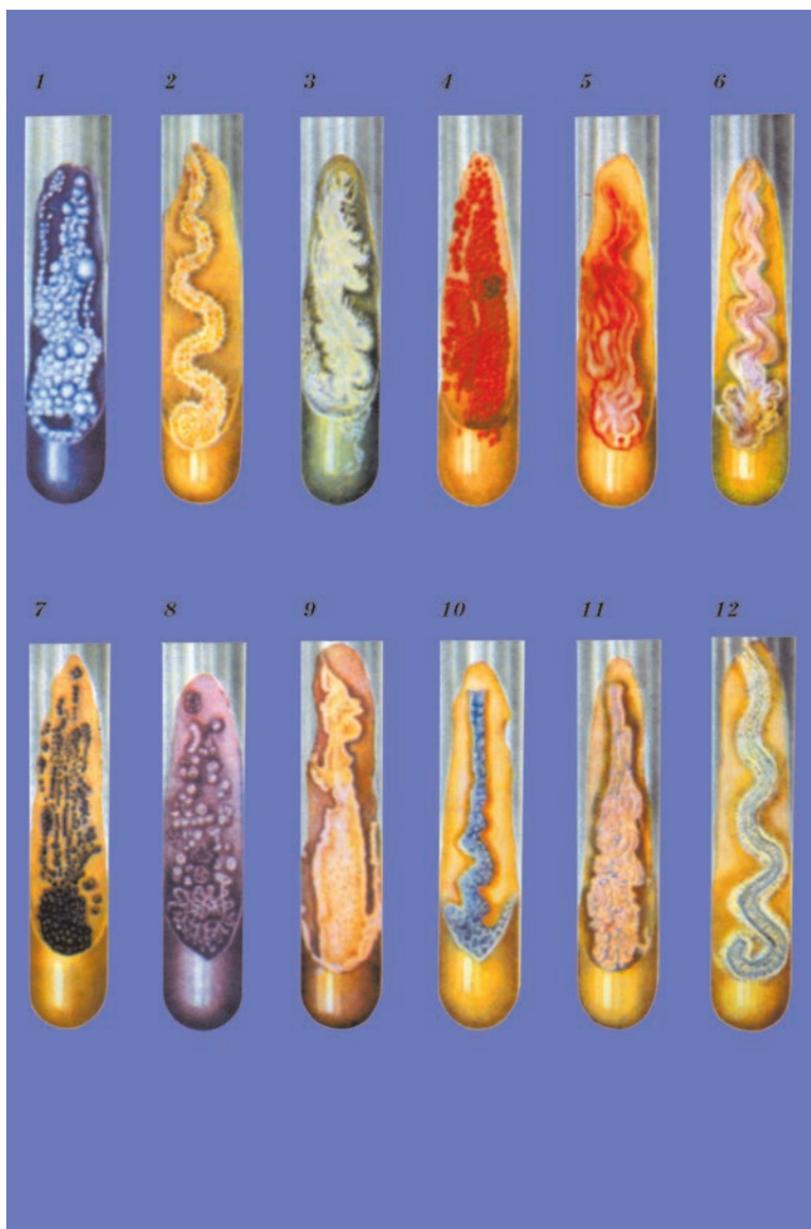


Рис. IV

Культуры грибов рода *Actinomyces* на питательных средах:

- 1 — *A. indigicolor*; 2 — *A. globishorus*; 3 — *A. viridans*; 4 — *A. aurantiacus*; 5 — *A. aureovercillatus*; 6 — *A. fluorescens*; 7 — *A. violaceus niger*; 8 — *A. violaceus*; 9 — *A. violaceo-chromogenes*; 10 — *A. viridis*; 11 — *A. lavendulae*; 12 — *A. griseus*.

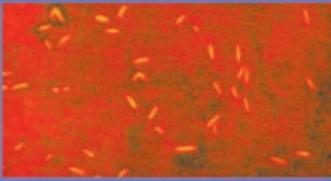
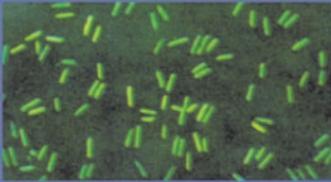


Рис. V
Возбудители
туберкулеза и бруцеллеза:
1 — *Myc. avium* при туберкулезе
птиц; 2 — *B. Abortus bovis* при
бруцеллезе.

Рис. VI
Характерный рост
Bac. anthracis
в мясо-пептонной желатине
(суточная культура)



Рис. VII
Бациллы сибирской язвы, выделенные из трупа. Окраска по Гинсу



Рис. VIII
Пуллороз:

1 — цыплята, больные пуллорозом; 2 — 48-часовая культура *Salmonella pullorum-gallinarum* (окраска по методу Грама, $\times 630$); 3 — увеличение и припухлость сережки при внутрикожном введении пуллорина (положительная реакция); 4 — сывороточно-капельная отрицательная (слева) и положительная (справа) реакция агглютинации.

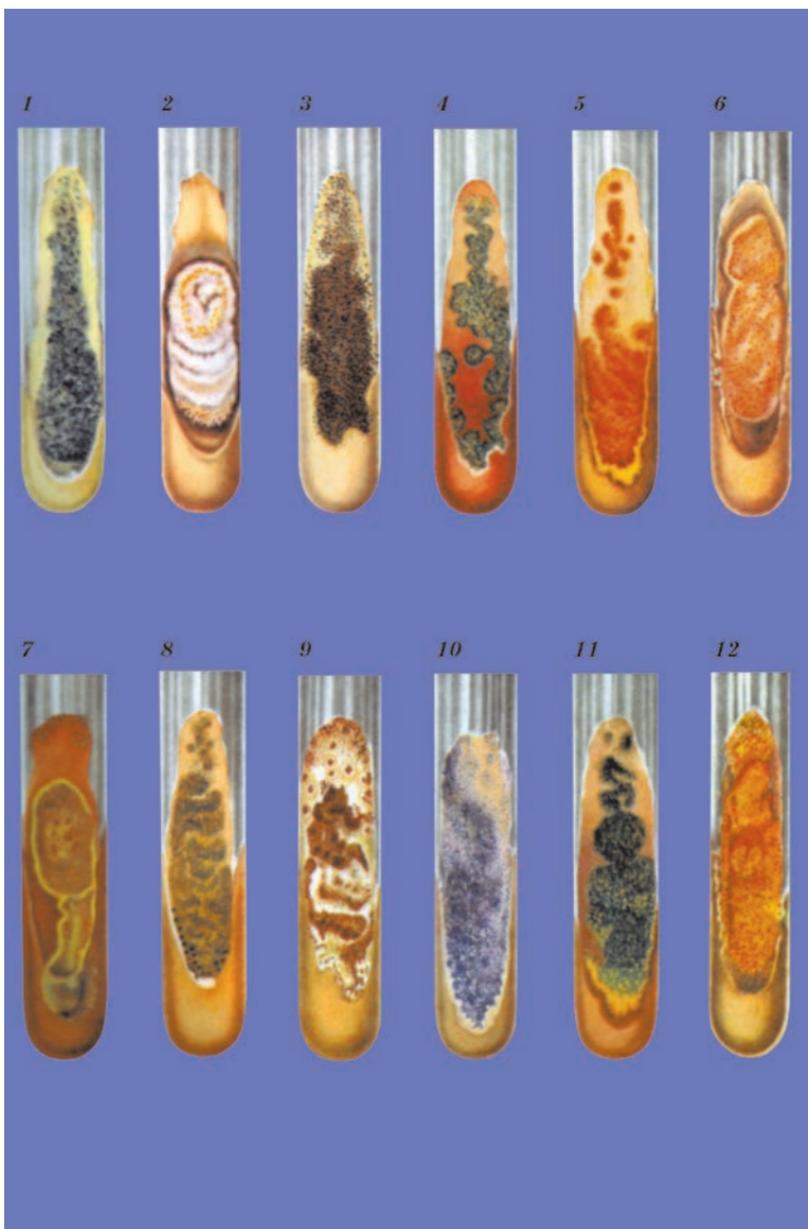


Рис. IX

Культуры грибов рода *Aspergillus* на агаре Чапека:

1 — *A. fumigatus*; 2 — *A. candidus*; 3 — *A. niger*; 4 — *A. versicolor*; 5 — *A. terreus*; 6 — *A. flavites*; 7 — *A. repens*; 8 — *A. flavus*; 9 — *A. wentii*; 10 — *A. clavatus*; 11 — *A. nidulans*; 12 — *A. Ochraceus*.

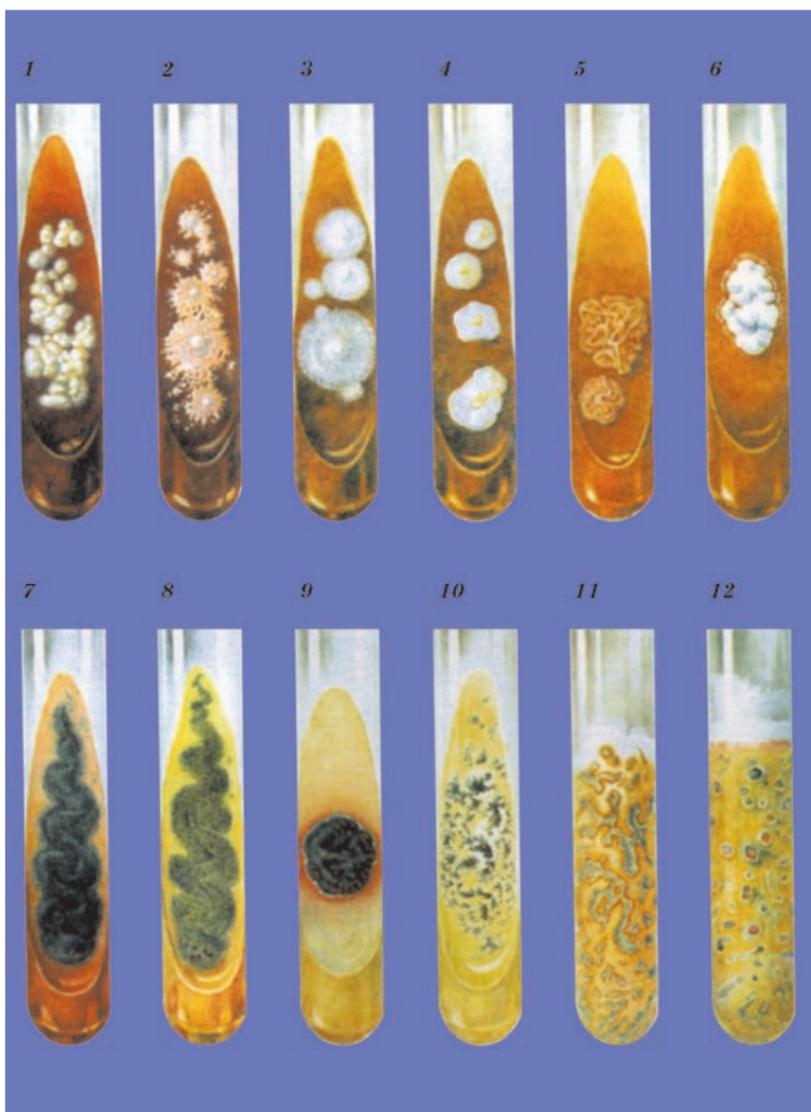


Рис. X

Культуры патогенных и токсичных грибов на питательных средах
(по Саркисову):

грибы патогенные: 1 — *Trichophyton verrucosum*; 2 — *Trichophyton gypseum*; 3 — *Microsporum lanosum*; 4 — *Candida albicans* (культуры на сусло-агаре); 5 — *Histoplasma farciminosum* (культура на МПА с 2% глюкозы); 6 — *Actinomyces bovis*, аэробная форма (культура на МПА с 1% глюкозы); 7 — *Aspergillus fumigatus* (культура на агаре Чапека);
грибы токсичные: 8 — *Aspergillus flavus*; 9 — *Penicillium notatum*; 10 — *Dendrodochium toxicum* (культуры на агаре Чапека); 11 — *Fusarium sporotrichioides*; 12 — *Fusarium graminearum* (культуры на зернах риса).