

Министерство науки и высшего образования РФ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Мурманский государственный технический университет»

Кафедра микробиологии
и биохимии

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Методические указания к лабораторным работам
по дисциплине Б1.В.06 «Техническая микробиология»
для обучающихся по направлению подготовки
19.06.01 «Промышленная экология и биотехнология»,
направленность программы «Технология и товароведение пищевых
продуктов функционального и специализированного назначения и
общественного питания»*

Мурманск, 2019

УДК 664.9:579 (076.5)

ББК 36.92-1я7

М59

Составители: Ускова Инга Владимировна - к.б.н., доцент кафедры
микробиологии и биохимии;

Методические указания рассмотрены и одобрены кафедрой микробиологии и
биохимии МГТУ, протокол № 12 от 18.06. 2019 года.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Лабораторная работа № 1. Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней.	5
Лабораторная работа № 2. Задачи микробиологических исследований, правила взятия материала для их проведения.	40
Лабораторная работа № 3. Микроскопия материала.	46
Лабораторная работа № 4. Культивирование микроорганизмов и биохимические методы индикации бактерий.	67
Лабораторная работа № 5. Индикация бактериальных антигенов.	90
Лабораторная работа № 6. Индикация антибактериальных антител.	98
Лабораторная работа № 7. Антибактериальные средства. Ограничение жизнедеятельности бактерий.	112
Вопросы для самоконтроля.	140
Список рекомендуемой литературы.	142

Лабораторная работа № 1.
**Устройство микробиологической лаборатории
и правила работы в ней.**

Требования к помещениям

Общее размещение лаборатории и ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям в зависимости от ее профиля. Лаборатория, в случае работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности, должна иметь разрешение в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

1. Классификация помещений

Помещения лаборатории подразделяют на следующие зоны:

- 1) рабочая зона для выполнения следующих операций:
 - приема, хранения, подготовки и обработки проб,
 - приготовления и стерилизации питательных сред и оборудования,
 - проведения исследования путем взвешивания, приготовления разведений, посева, пересева, термостатирования, сохранения штаммов и других лабораторных работ,
 - обеззараживания и очистки оборудования, ликвидации отходов исследований;
- 2) дополнительные зоны, включающие следующие помещения:
 - входы, коридоры, лестницы, лифты,
 - административные помещения - секретарская и офисная комнаты, комната для работы с документами и другие,
 - раздевалки и туалеты,
 - архивы,
 - склады;
- 3) при работе с патогенными для человека микроорганизмами помещения рабочей и дополнительных зон должны быть разделены также на «заразную» и «чистую» в соответствии с СП 1.2.731-99 Санитарные

правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

2. Требования к расположению помещений

Окружающие условия, в которых проводят микробиологические исследования, не должны влиять на их достоверность.

Помещения следует располагать таким образом, чтобы избежать опасности перезаражения. Для достижения этой цели необходимо организовать поточность прохождения чистых и загрязненных материалов и обеспечить непересечение потоков.

Следует обеспечить защиту от экстремальных условий, таких как повышенная температура, запыленность, влажность, пар, шум, вибрация, воздействие прямых солнечных лучей и т.д.

Площадь рабочей зоны должна быть достаточно большой для поддержания в ней чистоты и порядка. Во всех аналитических помещениях для каждого аналитика рекомендуется рабочее место площадью примерно 20 м².

Во время проведения испытаний в рабочую зону следует допускать только персонал, участвующий в проведении исследований.

Должны быть предусмотрены отдельные комнаты и/или отдельные зоны и/или специально огороженные участки для следующих операций:

- прием и хранение проб;
- подготовка проб, особенно в случае необработанного сырья (например порошкообразных продуктов, содержащих большое количество микроорганизмов);
- работа с патогенами (например *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*);
- приготовление и стерилизация питательных сред и оборудования;
- мойка стеклянной посуды и другого оборудования, а также обеззараживание оборудования и контаминированных питательных сред;
- проверка на стерильность пищевых продуктов.

Может быть также предусмотрено выделение следующих зон:

- для приготовления питательных сред и помещения для стерилизации питательных сред и оборудования;

- для обеззараживания и моечной.

Термостаты, холодильники, морозильные камеры могут быть размещены в отдельных, специально подготовленных комнатах.

3. Требования к оборудованию помещений

1. Чтобы уменьшить опасность загрязнения пылью и, следовательно, микроорганизмами, помещения для проведения испытаний должны быть устроены следующим образом:

- стены, потолок и пол должны быть гладкими, легко очищаемыми, устойчивыми к действию детергентов и дезинфицирующих веществ, используемых в лаборатории, полы не должны быть скользкими;

- помещения не должны пересекать водопроводные трубы, если они герметично не изолированы;

- окна с наружной стороны должны быть оборудованы системой защиты от прямого солнечного излучения (за исключением особых случаев);

- во избежание сквозняков во время проведения испытаний окна и двери должны закрываться герметично. Их конструкция должна препятствовать скоплению пыли и облегчать очистку.

2. Температура и качество окружающего воздуха (содержание микроорганизмов, влажность, запыленность и другое) должны соответствовать требованиям, предъявляемым к проведению испытаний. Для этого рекомендуется притяжная вентиляционная система, снабженная фильтрами. Допускается установка кондиционеров в рабочих помещениях и боксах в соответствии с СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

Если для испытаний требуется очень чистая атмосфера, то помещение должно быть оборудовано ламинарным шкафом с очисткой воздуха и/или безопасным боксом. Это оборудование должно быть снабжено соответствующими инструкциями.

3. Верхняя поверхность лабораторного инвентаря и мебели должна быть изготовлена из гладкого непроницаемого материала, легко очищаемого и дезинфицируемого. Для предупреждения накопления пыли шкафы должны достигать потолка.

Конструкция лабораторной мебели не должна затруднять уборку помещения (например передвижная мебель). Документация, используемая при работе с пробами, питательными средами, реактивами и т. д., должна храниться в закрытых шкафах.

Примечание - редко используемые документы и книги желательно размещать вне рабочей зоны.

4. В помещениях должно быть хорошее освещение, без мешающих световых бликов. Следует избегать попадания прямого солнечного света на рабочее место, чувствительное оборудование, в частности, термостаты.

4. Требования по уходу и контролю

Полы, стены, полки, лабораторный инвентарь и мебель следует содержать в чистоте и ремонтировать, чтобы избежать образования трещин, которые могут способствовать скоплению грязи и тем самым являться источником заражения.

Для поддержания в помещениях условий, пригодных для выполнения исследований, проводят регулярную уборку и дезинфекцию. Дезинфекцию различных объектов при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности проводят в соответствии с СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

Постоянно проводят проверку исправности вентиляционных установок и их фильтров, в случае необходимости фильтры заменяют.

Регулярно контролируют микробиологическое состояние поверхностей стен, рабочих мест и воздуха в помещениях рабочей зоны.

Загрязнение поверхностей может быть определено наложением на них контактных пластин, содержащих подходящие нейтрализующие соединения.

Качество воздуха может быть установлено путем экспонирования в течение 15 мин открытых чашек Петри, содержащих неселективную агаровую питательную среду (например МПА - мясопептонный агар).

Примечание - при определении загрязнения поверхностей и воздуха могут быть использованы и другие методы.

Аппаратура и оборудование

Вся аппаратура и оборудование должны содержаться в чистоте и в рабочем состоянии. Операции по обслуживанию и ремонту должны контролироваться. Приборы, оборудование и средства измерений должны быть аттестованы и подвергнуты метрологическому контролю в установленные сроки, иметь технический паспорт и другую документацию в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

1. Микробиологические боксы

Бокс (боксовые помещения или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности) - защищенное от пыли рабочее место, оборудованное установкой для горизонтального или вертикального ламинарного потока воздуха. В микробиологии используют безопасные боксы с улавливанием микроорганизмов фильтрами. При работе с патогенными микроорганизмами устройство боксов и их эксплуатация должны проводиться в соответствии с СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами». По степени очистки от пыли боксы условно делят на классы в соответствии с максимально допустимым количеством частиц размером более $0,5 \text{ мкм/м}^3$. Для боксов, применяющихся в пищевой микробиологии, количество частиц не должно превышать 4000 в кубическом метре.

Боксы могут быть двух типов:

а) бокс биологической безопасности с очисткой воздуха, который предназначен для защиты продукта от внешнего заражения и сведения к минимуму заражения, связанного с оператором;

б) боксированное помещение, предназначенное для предохранения продукта от внешнего заражения, а также защиты оператора и окружающей среды.

При всех работах с патогенами следует использовать, как минимум, боксированные помещения.

Требования к обслуживанию и контролю

Эффективность работы боксов биологической безопасности должна проверяться квалифицированным персоналом при вводе в эксплуатацию и далее не реже одного инспектирования в год. Если боксы оснащены фильтрами притяжной вентиляции, последние должны систематически заменяться.

После работы боксы убирают и дезинфицируют. Периодический контроль на всевозможные микробные загрязнения рабочих поверхностей и стен бокса проводят с помощью обычного оборудования. Например, путем экспонирования в течение 30 мин в каждом боксе нескольких открытых чашек Петри, содержащих неселективную агаровую питательную среду (например МПА). Могут быть использованы и другие методы.

2. Весы.

Использование

Лаборатория пищевой микробиологии должна быть оснащена для взвешивания различных продуктов весами нужного диапазона и классов точности взвешивания $\pm 0,01$ и $\pm 0,0001$ г.

Эти весы используют главным образом для взвешивания навесок анализируемой пробы, компонентов питательных сред и реактивов. Они могут быть использованы для измерения путем взвешивания объемов жидкостей, применяемых для разведений.

Требования к обслуживанию и контролю

Весы должны быть размещены на устойчивой горизонтальной подставке, защищенной от вибрации, и постоянно проверяться по рабочему эталону, желательно каждый рабочий день. Проверка весов проводится не реже одного раза в год квалифицированным специалистом по всему диапазону измерения.

При необходимости чашки весов очищают после каждого взвешивания, но не реже одного раза в день. Механизм весов должны чистить и проверять квалифицированные специалисты не реже одного раза в год.

3. Гомогенизатор

Гомогенизатор используют для приготовления исходной суспензии из испытуемой пробы нежидких продуктов. Могут применяться следующие приборы:

- гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (типа Стомахер и др.); может быть оснащен таймером и регулировкой скорости;

- ротационный гомогенизатор со скоростью вращения 8000-45000 об/мин, со стеклянными или металлическими резервуарами, снабженными крышками и выдерживающими условия стерилизации.

В особых случаях гомогенизацию можно проводить с помощью выдерживающих стерилизацию стеклянных шариков, имеющих соответствующий диаметр (приблизительно 6 мм).

Порядок работы

Время обработки пробы на перистальтическом гомогенизаторе обычно составляет от одной до двух минут. Этот тип гомогенизатора не используют для следующих пищевых продуктов:

- продукты, способные прокалывать пакет (в связи с наличием острых, твердых или сухих частиц);

- продукты которые трудно гомогенизировать из-за структуры (например колбасы типа салями).

Продолжительность работы ротационного гомогенизатора должна подбираться таким образом, чтобы общее количество оборотов ротора находилось в пределах 15000-20000. Однако даже в случае гомогенизаторов с низкой скоростью вращения ротора время обработки не должно превышать 2,5 мин.

Метод приготовления суспензии путем встряхивания пробы со стеклянными шариками может быть использован в случае вязких или густых продуктов, в частности молочных продуктов.

Обслуживание и контроль

Обслуживание и контроль приборов для гомогенизации проводят в соответствии с инструкциями изготовителя.

4. рН-метр

Описание прибора

рН-метр используют для измерения при определенной температуре разности потенциалов между измеряющими электродом и электродом сравнения, погруженным в продукт. Точность измерения должна составлять $\pm 0,1$ рН, порог чувствительности – 0,01 рН. Прибор должен быть снабжен ручным или автоматическим компенсатором температуры.

Примечание – измеряющий электрод и электрод сравнения часто размещают в одном комбинированном электроде.

Использование прибора

рН-метр используют для измерения и коррекции питательных сред, реактивов, а также испытуемой пробы или приготовленной суспензии. рН-метр должен соответствовать стандартам на конкретный вид продукта, в которых должны быть предусмотрены условия измерения и коррекции конкретный вид продукта, в которых должны быть предусмотрены условия измерения и коррекции рН, а также методы очистки и обеззараживания электродов.

Обслуживание и контроль

pH-метр градуируют в соответствии с инструкциями изготовителя, используя не менее двух стандартных буферных растворов, не раньше, чем за день до применения. Значения pH стандартных растворов должны быть известны с точностью до второго знака после запятой при заданной температуре (обычно pH 4,0 и 7,0 при 20°C). Измеряемое значение pH должно находиться между значениями pH стандартных растворов.

Электроды проверяют и эксплуатируют в соответствии с инструкциями изготовителя. В частности, постоянно проверяют:

- состояние электродов с учетом их старения и загрязнения;
- временные характеристики и устойчивость показаний.

Перед началом измерений проверяют, были ли рабочие части электродов полностью погруженными в дистиллированную воду или в любую другую жидкость, рекомендованную изготовителем, в противном случае до проведения измерений их выдерживают в дистиллированной воде или в рекомендованной жидкости в течение 24 ч.

Электроды очищают после каждого измерения. Принимая во внимание загрязнение и старение электродов, периодически проводят их более тщательную очистку в соответствии с инструкциями изготовителя.

Электроды хранят в соответствии с инструкциями изготовителя.

5. Автоклав

Описание

Автоклав - аппарат, обеспечивающий достижение температуры насыщенного пара не ниже 121°C для уничтожения микроорганизмов.

Использование

Автоклав не должен использоваться одновременно для стерилизации чистого и загрязненного использованного оборудования (и/или питательных сред). Для этих процессов применяют отдельные автоклавы.

Автоклав должен быть оборудован (рис. 1):

- по крайней мере одним предохранительным клапаном;
- манометром;

- сливным краном;
- регулирующим устройством, обеспечивающим поддержание температуры с погрешностью не более $\pm 1^{\circ}\text{C}$ от заданного значения (кроме особо оговоренных случаев);
- контрольным максимальным термометром или измерительной термопарой. Желательно, чтобы автоклав был снабжен указателем продолжительности операций или программируемым таймером.

При стерилизации паром перед подъемом давления весь воздух должен быть вытеснен.

Если автоклав не оснащен автоматическим устройством для откачки воздуха, его необходимо вытеснять до появления непрерывной струи пара.

Обслуживание и контроль

Автоклавы поддерживают в рабочем состоянии; их регулярный контроль осуществляют компетентные органы в соответствии с инструкциями изготовителя.

Все измерительные приборы автоклава содержат в безупречно работающем состоянии и подвергаются проверке в установленные сроки.

Систематически удаляют накипь и проверяют герметичность автоклава.

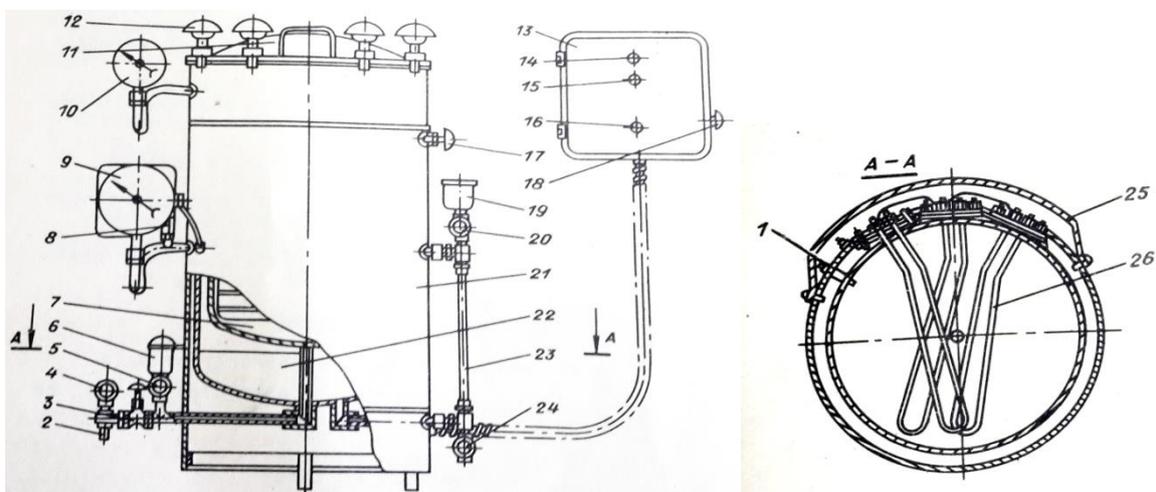


Рисунок 1. Стерилизатор паровой ВК-75:

1 – датчик уровня воды; 2 – эжектор; 3, 4, 5, 17, 20, 24 – вентиль; 7 – стерилизационная камера; 8 – предохранительный клапан; 9 – электроконтактный манометр; 10 – мановакуумметр; 11 – крышка; 12 – прижим; 13 – электрощит; 14, 16 – сигнальная лампа; 15 – предохранитель; 18 – рукоятка выключателя; 19 – воронка; 21 – кожух; 22 – водопаровая камера; 23 – водоуказательная колонка; 25 – коробка; 26 – электронагреватель.

6. Термостат

Описание

Термостат состоит из камеры, обеспечивающей поддержание стабильной температуры и равномерное ее распределение с погрешностью $\pm 1^\circ\text{C}$, кроме особо оговоренных случаев.

Использование

Термостат должен быть снабжен системой, обеспечивающей поддержание стабильной температуры на заданном уровне равномерно по всему внутреннему рабочему объему.

Если температура окружающей среды близка или превышает температуру в термостате, камеру необходимо оборудовать охлаждающей системой.

Термостат должен быть защищен от воздействия прямого солнечного света.

Термостат не следует загружать полностью за один прием, поскольку это приведет к увеличению времени установления постоянной температуры в питательных средах, независимо от типа используемого термостата - с принудительной воздушной вентиляцией или без нее. Загрузку термостата необходимо проводить так, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха в камере; чашки Петри и пробирки размещают на расстоянии не менее 25 мм от внутренних стенок термостата. Количество чашек Петри в стопках не должно превышать шести, расстояние между стопками - не менее 25 мм.

Обслуживание и контроль

Установление постоянной температуры в рабочем объеме контролируют несколькими термостатами или термопарами.

Погрешность измерения должна быть в четыре раза меньше, чем требуемая точность поддержания температуры (например при требуемой точности $\pm 2^{\circ}\text{C}$, погрешность измерения должна составлять $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Стабильность температуры контролируют с помощью одного или нескольких максимальных и минимальных термометров.

Температуру в термостате необходимо проверять каждый рабочий день, для чего термостат должен быть снабжен, по крайней мере, одним термометром, шарик которого погружен в глицерин, содержащийся в закрытом сосуде. Могут быть использованы другие контролирующие системы или аналогичные устройства.

Внутренние и внешние стенки термостата систематически очищают, дезинфицируют и, при необходимости, удаляют пыль из вентиляционной системы.

7. Холодильник или холодильная камера

Описание

Камеры должны гарантированно обеспечивать хранение при пониженных температурах. Кроме особо оговоренных случаев, температура

должна составлять $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$, исключением является консервация проб для исследований, когда температура должна быть $(2 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Использование

Для хранения стерильных питательных сред и реактивов, проб для исследований, культур микроорганизмов и инкубированных сред используют отдельные камеры.

Холодильники и холодильные камеры необходимо загружать таким образом, чтобы поддерживалась достаточная циркуляция воздуха.

Обслуживание и контроль

Температуру в каждой камере проверяют каждый рабочий день с помощью термометра или встроенного датчика. Погрешность измерения должна быть в четыре раза меньше, чем требуемая точность поддержания температуры (например при требуемой точности $\pm 2^\circ\text{C}$, погрешность измерения должна составлять $\pm 0,5^\circ\text{C}$).

За холодильными камерами должен проводиться постоянный уход:

- удаление пыли с лопастей и внешних пластин теплообменника;
- размораживание;
- очистка и дезинфекция внутренней части камер.

8. Морозильная камера

Описание

Морозильная камера должна гарантированно обеспечивать хранение в замороженном состоянии. Температура, кроме особо оговоренных случаев, должна быть не выше минус 18°C , желательно минус $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Использование

Отдельные морозильные камеры используют для хранения:

- стерильных питательных сред и реактивов;
- проб для исследований;
- культур микроорганизмов.

Морозильная камера должна загружаться таким образом, чтобы поддерживалась достаточно низкая температура, в особенности, если в нее помещают незамороженные продукты.

Обслуживание и контроль

Температуру в каждой камере проверяют каждый рабочий день с помощью термометра или встроенного датчика. Погрешность измерения должна быть в четыре раза меньше, чем требуемая точность поддержания температуры (например при требуемой точности $\pm 2^{\circ}\text{C}$, погрешность измерения должна составлять $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

За холодильными камерами должен проводиться постоянный уход:

- удаление пыли с лопастей и внешних пластин теплообменника;
- размораживание;
- очистка и дезинфекция внутренней части камер.

9. Баня с терморегулятором

Описание

Баня должна поддерживать заданную температуру с погрешностью $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, кроме особо оговоренных случаев. Рабочие температуры оговариваются в каждом используемом методе.

Использование

Баню используют для:

- сохранения стерильной расплавленной агаровой среды при температуре $(47 \pm 2)^{\circ}\text{C}$;
- культивирования засеянных питательных сред при постоянной температуре;
- приготовления исходных растворов при заданной температуре (например при приготовлении исходных суспензий казеинатов требуется поддерживать температуру 37°C в течение 15 мин);
- тепловой обработки исходных суспензий при определенной температуре (например, при подсчете спор может потребоваться разрушение вегетативных клеток).

Для точного термостатирования баня должна быть оснащена циркуляционным водяным насосом и системой автоматического терморегулирования. Перемешивание воды не должно сопровождаться разбрызгиванием капель.

Обслуживание и контроль

Каждая баня должна быть оснащена термометром или термопарой, независимой от автоматической системы терморегуляции.

Температуру бани контролируют в течение всего времени ее использования, желательно ежедневно.

Необходимо регулярно проверять уровень жидкости в бане (воды, этиленгликоля и других). Во избежание микробного загрязнения жидкость часто меняют.

10. Стерилизационный сушильный шкаф

Описание

Стерилизационный сушильный шкаф - камера, которая должна обеспечивать поддержание температуры от 170 до 180°C для разрушения микроорганизмов воздействием сухого горячего воздуха.

Использование

В стерилизационном шкафу стерилизуют только стеклянное и металлическое оборудование. После достижения нужной температуры стерилизация должна продолжаться не менее одного часа.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Мерную стеклянную посуду не следует обеззараживать в стерилизационном шкафу.

Температура должна быть равномерной по всему шкафу. Шкаф должен быть снабжен:

- терморегулятором;
- термометром или измерительной термопарой.

Желательно, чтобы шкаф был оборудован также индикатором продолжительности работы или программируемым устройством/таймером.

Обслуживание и контроль

Проверяют равномерность температуры во всем рабочем объеме.

Стерилизационный шкаф содержат в хорошем рабочем состоянии. Измерительные приборы подвергают проверке в установленные сроки. Рекомендуется постоянная очистка шкафа.

11. Микроволновая печь

Описание

Микроволновая печь - аппарат, обеспечивающий нагрев продукта с помощью микроволнового излучения.

Использование

Микроволновую печь можно использовать только для расплавления агаровых питательных сред.

Существующие аппараты работают при обычном атмосферном давлении. Они способны нагревать питательные среды в контролируемых условиях с помощью цикла микроволнового излучения.

Для исключения перегрева микроволновое поле должно равномерно распределяться по объему нагреваемой среды. Для лучшего распределения тепла необходимо использовать аппарат с вращающимся поддоном.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Микроволновую печь используют с осторожностью, так как перегрев агаровых питательных сред в ней может привести к задержке закипания.

Примечание - ввиду недостаточного обоснования эффективности использования микроволн для стерилизации питательных сред, это направление их использования в данный стандарт не включено.

12. Оптический микроскоп

Использование

Оптический микроскоп содержит объективы с разным увеличением. Объектив с большим увеличением и масляной иммерсией позволяет исследовать морфологию микроорганизмов в водной суспензии или после фиксации. Желательно оснащение микроскопа фазово-контрастным объекти-

вом и подплатформенным конденсором для улучшения условий исследования живых культур.

Примечание - платформенные микроскопы с малым увеличением и идеальным стереоскопическим фокусированием подходят для изучения колоний бактерий в питательной агаровой среде или на ее поверхности.

Обслуживание и контроль

После работы с применением иммерсии линзы очищают от использованных иммерсионных веществ, не допуская ухудшения их оптических свойств.

Не реже одного раза в год уполномоченный сотрудник лаборатории должен проводить генеральную чистку микроскопа, а также проверку его механической и оптической частей.

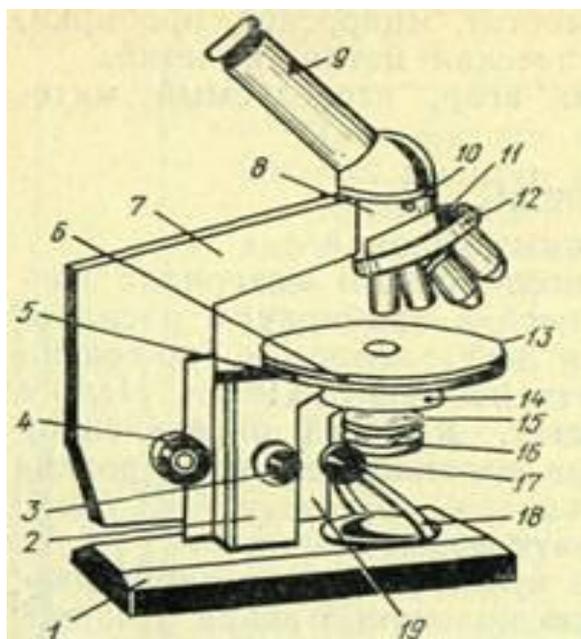


Рисунок 2. Схема микроскопа: 1 – основание микроскопа; 2 – коробка с механизмом микрометрического фокусирования; 3 – микрометрический винт; 4 - макрометрический винт; 5 и 6 – винты для перемещения столика; 7 – тубусодержатель; 8 – головка микроскопа; 9 – насадка монокулярная (тубус с окуляром); 10 – винт для крепления насадки; 11 – винт, фиксирующий револьвер относительно тубуса; 12 – револьвер с объективами; 13 – предметный столик; 14 – винт для крепления конденсора; 15 – конденсор; 16 – дополнительная линза; 17 – рукоятка кронштейна; 18 – зеркало или лампа; 19 – кронштейн.

13. Газовая, спиртовая горелки или прокаливатель проволоки

Газовую и спиртовую горелки используют для создания и поддержания защитной зоны вокруг пламени. Они применяются для стерилизации металлических игл и петель путем доведения их до красного каления.

При работе с патогенными бактериями для стерилизации металлических игл и петель предпочтительнее использовать прокаливатель проволоки.

14. Дозатор питательных сред и реактивов

Описание

Дозатор - инструмент или аппарат, применяемый для дозирования питательных сред и реактивов в пробирки, флаконы или чашки Петри (например мерный цилиндр, обычная пипетка, автоматическая пипетка, перистальтический насос или аппарат для автоматической подачи).

Использование

Если требуется асептическое дозирование питательных сред или реактивов, все части инструмента или аппарата, контактирующие с разливаемым продуктом, должны быть стерильными. Точность инструментов или аппаратов должна соответствовать точности измерения разливаемых объемов. При приготовлении десятикратных разведений относительная погрешность измерения объемов жидкости, используемой для разбавлений, не должна превышать $\pm 2 \%$.

Обслуживание и контроль

Дозаторы содержат в безукоризненном состоянии в соответствии с инструкциями изготовителя. Дозируемые объемы регулярно контролируют.

15. Механический смеситель

Аппарат используется для равномерного перемешивания различных жидкостей (например, десятикратных разведений и жидких проб) или для получения жидкой суспензии бактериальных клеток. Принцип действия основан на приведении содержимого пробирок в некруговое (вихревое) вращение (приборы типа Vortex).

16. Прибор для подсчета колоний

Прибор должен быть оборудован осветительной системой с темной подложкой, увеличительным стеклом с увеличением на менее 1,5х и механическим или электронным счетчиком. Для подсчета могут быть использованы любые другие равноценные автоматические устройства для подсчета и равноценные по производительности (например, лазерный счетчик).

17. Оборудование для культивирования в модифицированной атмосфере

Описание оборудования

Герметически закрываемый сосуд или любые другие соответствующие аппараты, способные поддерживать искусственную атмосферу, в которой находится питательная среда, на все время ее инкубирования (например, анаэробное термостатирование). Могут быть использованы другие устройства аналогичного действия, например, анаэробные камеры. Установку и эксплуатацию проводят по инструкциям изготовителя.

Использование оборудования

Состав модифицированной атмосферы, получаемой путем смешивания газов (например, из газовых баллонов) или с помощью других подходящих средств (готовые покупные упаковки с газом), должен быть оговорен в нормативном документе.

Обслуживание и контроль

В каждой камере во время ее использования должен находиться индикатор состава атмосферы. Если используют катализатор, его регулярно регенерируют в соответствии с инструкциями изготовителя. Оборудование для инкубирования в модифицированной атмосфере регулярно очищают и обеззараживают.

18. Прочее оборудование

Для проведения исследований используют и другое оборудование и приспособления: устройства для фильтрования, стеклянные или пластиковые

емкости (пробирки, флаконы, бутылки), стеклянные или пластиковые чашки Петри (как правило, диаметром от 90 до 100 мм), стеклянные или пластиковые пипетки вместимостью 10, 2, 1 см³, инструменты для отбора проб, иглы и петли хромовоникелевые, платиноиридиевые, одноразовые пластиковые и из других материалов.

Требования к персоналу

1. Компетенция

Весь персонал, работающий в микробиологической лаборатории, должен быть соответствующим образом подготовлен для правильного выполнения операций, возложенных на него. Персонал, выполняющий работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности, должен отвечать требованиям СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

Сотрудники, отвечающие за проведение испытаний, должны иметь хорошее знание и практический опыт работы с изучаемыми микроорганизмами и микробиологическими методами. Они должны уметь оценивать точность и воспроизводимость, требуемые для получения достоверных результатов. Для этого они могут, например, принимать участие в круговых сличительных испытаниях, использовать стандартные образцы или проводить самооценочные тесты на определение количества микроорганизмов.

Весь персонал должен получать по мере необходимости актуализированную информацию по вопросам гигиены и безопасности работ в лаборатории.

2. Личная гигиена

Во избежание заражения проб и питательных сред, а также для предупреждения инфицирования персонала предпринимают следующие меры предосторожности:

- лабораторная одежда должна быть светлой, чистой и хорошего качества, фабричного изготовления из малогорючего материала. В этой одежде нельзя выходить из рабочей зоны, в частности, в туалет;

- надевают, если это необходимо, защитные повязки на голову и бороду;

- при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности применяют средства индивидуальной защиты согласно СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

- ногти содержат в исключительной чистоте, хорошо ухоженными, желательны короткими;

- до и после микробиологических исследований и непосредственно после посещения туалета необходимо мыть руки теплой водой, желательны из нерегулируемого в ручную крана, используя жидкое или порошковое мыло или дезинфицирующее средство, поступающее из дозирующего устройства, содержащегося на должном уровне чистоты. Для сушки рук используют одноразовые бумажные или матерчатые полотенца;

- при посеве необходимо избегать разговоров, кашля и т. д.;

- не курить, не пить и не принимать пищу в рабочей зоне;

- особые предосторожности должны предприниматься лицами, имеющими инфекцию (панариций) или заболевание, возбудители которого способны заражать пробу, что отразится на результатах;

- не хранить пищевые продукты для личного потребления в лабораторных холодильниках.

Подготовка оборудования

1. Предварительная подготовка

Подготовка оборудования, используемого в микробиологии, должна гарантировать его чистоту и стерильность вплоть до момента использования.

Оборудование, включая новое, должно быть вымыто перед применением.

Пробирки и флаконы закрывают перед стерилизацией подходящим образом (ватными, металлическими пробками и т. д.). В концы пипеток вкладывают по кусочку ваты или других подходящих материалов.

При необходимости стерилизуемое оборудование помещают в специальные контейнеры или заворачивают в подходящий материал (специальная бумага, алюминиевая фольга и другие). Оборудование стерилизуют в автоклаве отдельно от сред и других водных растворов, доступ пара к нему должен быть свободным, иначе стерилизация будет неэффективной.

2. Стерилизация оборудования

Стерилизация сухим горячим воздухом

Оборудование нагревают в стерилизационном шкафу не менее 1 ч при температуре от 170 до 180°C.

Стерилизация влажным паром

Оборудование нагревают не менее 15 мин при температуре 121°C и выше в автоклаве, желательно снабженном вакуумной сушилкой. Используют термоиндикаторы для контроля достижения требуемой температуры (например специальную бумагу).

Стерилизация оборудования, используемого для отбора проб

Допускается стерилизация оборудования, применяемого для отбора проб (посуды, инструмента и материалов).

3. Оборудование одноразового использования

Одноразовое оборудование используют таким же образом, как и стеклянную посуду многоразового использования (чашки Петри, пипетки, флаконы, пробирки и другое), если они имеют сходные технические характеристики.

Поэтому желательно получить у изготовителя подтверждение, что предлагаемое оборудование пригодно для микробиологического использования (особенно по стерилизуемости) и что материал не содержит веществ, ингибирующих рост микроорганизмов.

Одноразовое оборудование перед уничтожением обеззараживают. Помимо методов, приведенных в п. 6, может применяться сжигание. Если имеется в распоряжении прокаливатель, обеззараживание и уничтожение могут быть совмещены в одной операции.

4. Содержание чистого оборудования

Чистое оборудование хранят в условиях, обеспечивающих сохранность его чистоты и защиту от пыли.

5. Содержание стерильного оборудования

Перед использованием оборудование хранят в условиях, обеспечивающих сохранность его стерильности. Одноразовое оборудование хранят в соответствии с рекомендациями изготовителя, без повреждения упаковки. Оборудование, подготовленное в лаборатории, хранят в чистых контейнерах.

При приобретении готового стерильного оборудования для микробиологических целей, проверяют на каждой упаковке наличие информации о сроке годности (или дате изготовления). Герметически упакованное оборудование хранят не более трех месяцев. Упакованное, но не закрытое герметически оборудование хранят в течение более короткого срока (например, 8 дней).

6. Обеззараживание

После использования (культивирования микроорганизмов или контакта с ними) оборудование и его содержимое, независимо от вида микроорганизмов, обеззараживают перед очисткой или уничтожением. Например, ватные тампоны удаляют из пипеток только после обеззараживания последних, пробирки с жидкой средой обеззараживают непосредственно перед мойкой. Обеззараживание проводят одним из следующих способов:

- стерилизацией влажным паром в автоклаве не менее 30 мин при температуре 121°C и выше всего оборудования и материалов, которые

контактировали с культурами микроорганизмов (посевы на твердых или жидких питательных средах, зараженные реактивы, оборудование и другое);

- путем погружения коррозионно-устойчивого оборудования, например пипеток, в дезинфицирующий раствор (пипетки полностью погружают в вертикальном положении в раствор, избегая образования в каналах пузырьков воздуха).

При работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности обеззараживание оборудования проводят согласно СП 1.2.731-99 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

Пластиковые пипетки используют только однократно. Оборудование из пластмасс может быть сожжено без обеззараживания, если это допускается законами страны.

7. Мойка

Оборудование моют только после его обеззараживания. Емкости освобождают от их содержимого. Перед мойкой удаляют с пробок и колпачков печати, если они имеются.

Тщательно моют пробки, колпачки и стеклянную посуду в горячей воде раствором готового детергента.

При его отсутствии может быть использован раствор карбоната натрия массовой долей 0,125 % с последующим погружением в разбавленную кислоту (например соляную кислоту HCl концентрации $c = 0,1$ моль/дм³).

Все оборудование промывают дистиллированной или равноценной по качеству водой.

Для облегчения операций очистки могут быть использованы специальные устройства (например, моечные аппараты для пипеток, чашек, ультразвуковые аппараты и другие).

Приготовление и стерилизация питательных сред и реактивов

Тщательное приготовление питательных сред - один из основных этапов микробиологического исследования, требующий особого внимания.

1. Дистиллированная вода

Используемая вода должна быть дистиллированной или равноценной по качеству, то есть свободной от веществ, способных ингибировать или воздействовать на рост микроорганизмов в период испытания. Если дистиллированную воду получают из хлорированной, перед перегонкой необходимо нейтрализовать хлор.

Дистиллированную воду хранят в емкостях, изготовленных из инертных материалов (например, нейтрального стекла, полиэтилена и т. д.), в которых перед использованием установлено отсутствие ингибирующих веществ.

Примечание - в ряде случаев необходимо использовать свежеприготовленную воду, свободную от растворенного диоксида углерода.

Качество воды оценивают по удельному сопротивлению, которое должно быть не менее 300000 Ом/см.

Примечание - из-за загрязнения при прохождении через ионообменник деминерализованная вода часто имеет повышенное содержание микроорганизмов, поэтому целесообразно проверять такую воду на их содержание. Следует проконсультироваться с изготовителем ионообменника о возможности применения улучшенных методов, уменьшающих микробиологическое заражение воды. После стерилизации путем фильтрования деионизированной воды, сильно контаминированной микроорганизмами, она, однако, еще может содержать вещества, ингибирующие рост некоторых микроорганизмов.

2. Приготовление питательных сред

Для приготовления питательных сред используют два способа:

- из отдельных сухих или жидких компонентов;
- из сухой готовой среды.

Емкости, содержащие отдельные сухие компоненты или сухую готовую среду, хранят в темном сухом месте при температуре, установленной изготовителем.

По истечении установленных сроков годности исходные компоненты и готовые среды не используют.

Если сухие компоненты и среды гигроскопичны, необходимо быстро и тщательно закрывать емкости после взятия навесок. Не используют сухие среды, имеющие признаки слеживания или затвердения, свидетельствующие о поглощении влаги.

Обводнение сухих готовых сред

Использование сухих готовых сред проводят в соответствии с требованиями нормативного документа на конкретную готовую среду и/или рекомендациями изготовителя.

Измерение рН

С помощью рН-метра измеряют и корректируют рН таким образом, чтобы после стерилизации и охлаждения до 25°C значение рН среды отличалось от требуемого не более чем на $\pm 0,2$ рН (если не оговорены другие условия).

Корректировку обычно проводят с помощью раствора гидроксида натрия (NaOH) концентрации 40 г/дм³ (примерно 1 моль/дм³) или соляной кислоты (HCl) концентрации 36,5 г/дм³ (примерно 1 моль/дм³).

Разливка сред

Среды разливают в соответствующие емкости вручную или с помощью автоматических аппаратов.

Для предупреждения выбрасывания среды при стерилизации в автоклаве используют емкость, имеющую объем в 2-3 раза больший объема разливаемой среды.

3. Стерилизация

Стерилизацию питательных сред и реактивов проводят различными способами, в том числе:

- влажным паром;
- фильтрованием.

В соответствии с требованиями нормативного документа на конкретный метод испытаний и/или рекомендаций изготовителя некоторые среды и реактивы используют без специальной стерилизации.

После стерилизации среды проверяют ее pH, цвет, стерильность и бактериологическую пригодность.

Влажная стерилизация

Влажная стерилизация проводится в отдельном автоклаве или в аппарате для приготовления и разлива сред. Обычно эту операцию проводят при температуре 121°C (245 кПа) в течение 15 мин. Для объемов сред, превышающих 1 дм³, продолжительность стерилизации может быть изменена. Во всех случаях следуют указаниям нормативного документа на конкретный метод испытания или инструкциям изготовителя.

Перед стерилизацией емкости со средами должны быть снабжены полосками термочувствительной бумаги (имеющейся в продаже) в количестве, достаточном для фиксации достижения желаемой температуры во всех частях автоклава.

Стерилизация фильтрованием

Стерилизацию фильтрованием проводят с использованием вакуума или избыточного давления.

При этом используют мембраны и фильтры диаметром пор 0,22 мкм. Перед применением они должны быть простерилизованы в автоклаве. Закупленные в готовом стерильном состоянии фильтрующие элементы или мембраны используют в соответствии с инструкциями изготовителя.

Различные детали фильтрующих устройств, в собранном или разобранном виде, стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121°C. В случае необходимости, после автоклавирования проводят сборку этих устройств в асептических условиях в стерильном боксе. Некоторые устройства в собранном виде могут быть закуплены в стерильном состоянии.

4. Хранение

Каждая упаковка бутылей, пробирок или чашек Петри должна быть этикетирована и содержать следующую информацию:

- название среды;
- дату приготовления и/или дату истечения срока годности.

Питательные среды и реактивы лабораторного изготовления

Питательные среды, разлитые в бутылки и пробирки, а также реактивы, не использованные немедленно, предохраняют от света и высыхания (например, используют при хранении резиновые пробки или завинчивающиеся крышки).

Если не оговорено в нормативном документе на конкретный метод испытания, среды хранят в холодильнике не более трех месяцев или при температуре 18-23°C не более одного месяца в условиях, не допускающих изменения их состава.

Подсохшие среды не используют.

Перед использованием желательно температуру питательной среды довести до температуры в помещении лаборатории.

Готовые питательные среды и реактивы

Готовые питательные среды и реактивы используют в соответствии с инструкциями изготовителя, в которых должны быть указаны сроки годности, температура и условия хранения, условия применения (рН и прочее), контроль качества.

5. Расплавление агаровых питательных сред

Питательные среды расплавляют на кипящей водяной бане или другим способом, который дает аналогичный результат (например текучим паром в автоклаве или с помощью микроволновой печи). Избегают перегрева среды и удаляют ее сразу же после расплавления. Перед использованием питательную среду содержат в расплавленном состоянии на бане с терморегулятором при температуре $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$. Питательную среду температурой выше 50°C не используют. Сохраняют расплавленную

питательную среду не более 8 ч. Не использованную до конца среду после ее затвердения не применяют.

В случае особо чувствительных питательных сред длительность нахождения в расплавленном состоянии следует сократить в соответствии с требованиями стандарта на конкретный метод испытания.

6. Деаэрирование питательных сред

При необходимости деаэрирования питательную среду нагревают непосредственно перед использованием на кипящей водяной бане или текущим паром в течение 15 мин, пробки или крышки приоткрывают. После прогревания их плотно закрывают и быстро охлаждают среду до рабочей температуры.

7. Подготовка чашек Петри

Расплавленную агаровую питательную среду наливают в чашки Петри таким образом, чтобы толщина ее слоя была не менее 2 мм (например для чашек диаметром 90 мм обычно требуется 12 см³ агаровой среды). Затем для охлаждения и затвердевания среды чашки Петри помещают на холодную горизонтальную поверхность.

Приготовленные таким образом чашки Петри используют немедленно или хранят при условиях, предупреждающих изменение их состава, т. е. в темноте и в холодильнике, не более одной недели. Этот срок может быть удлинён или сокращён согласно требованиям, установленным стандартом на конкретный метод испытания. Выполняют маркировку чашек. Чашки используют после подсушивания. При поверхностном посеве чашки обычно подсушивают с открытыми крышками и перевернутой вниз поверхностью агара в сушильном шкафу при температуре от 25 до 50°C до тех пор, пока с поверхности среды не исчезнут капли влаги, при этом стараясь не пересушить их дольше. Агар в чашках может быть также подсушен в ламинарном шкафу биологической безопасности выдерживанием в течение 30 мин с полуоткрытыми крышками или в течение ночи - в закрытом состоянии.

Готовые к использованию покупные чашки с агаром хранят и используют в соответствии с инструкциями изготовителя.

8. Приготовление исходной суспензии и разведений

Приготовление исходной суспензии и разведений ISO 6887-3:2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов».

Период времени между окончанием приготовления исходной суспензии и посевом на питательную среду не должен превышать 45 мин, если не оговорено иное в соответствующем стандарте на метод испытания конкретного вида продукта.

9. Метод подсчета с использованием твердой среды

Посев на агар в чашках Петри

Готовят среды (содержащуюся на водяной бане при 47°C в расплавленном состоянии), чашки Петри, жидкость для разведений и разведения, подлежащие исследованию, в объемах и количествах, предусмотренных планом посева, установленным в соответствии с конкретным стандартом на метод испытания.

В маркированные чашки Петри вносят предусмотренные объемы разведений, подлежащих исследованию. Наливают в каждую чашку необходимый объем среды. Незамедлительно и тщательно перемешивают расплавленную среду и посевной материал так, чтобы микроорганизмы равномерно распределились в массе среды. Для охлаждения и застывания оставляют чашки Петри на холодной горизонтальной поверхности (время затвердения агара не должно превышать 10 мин).

Если в исследуемом продукте предполагается присутствие микроорганизмов, образующих при росте налеты на поверхности среды («ползучий» рост колоний, например *Proteus spp.*), то при выполнении исследований чашки Петри с посевным материалом заливают сверху

стерильным голодным агаром или же агаром, идентичным питательной среде.

Поверхностный посев

Посевной материал вносят в центр маркированной чашки Петри на поверхность агаровой питательной среды. Как можно быстрее равномерно распределяют его по поверхности среды с помощью стерильного стеклянного или пластикового шпателя до тех пор, пока на поверхности агара не останется видимых следов жидкости.

Для улучшения распределения могут быть использованы стеклянные шарики. В некоторых случаях, установленных в стандартах на конкретные методы испытаний, посевной материал наносят на мембрану и затем распределяют с помощью стеклянных шариков.

Термостатирование

Засеянные чашки немедленно переворачивают и быстро помещают в термостат, установленный на соответствующую температуру (кроме особо оговоренных случаев). Если наблюдается чрезмерное обезвоживание среды (например, при 55°C или вследствие интенсивной циркуляции воздуха), чашки перед термостатированием неплотно укладывают в пластиковый пакет или аналогичное приспособление с тем же эффектом. В период термостатирования допускаются кратковременные колебания температуры, например, во время таких обычных операций, как загрузка или разгрузка термостата.

Примечание - в отдельных случаях, чтобы не спутать частицы исследуемого продукта с колониями микроорганизмов, полезно приготовить дубликаты засеянных чашек, которые хранят при температуре 2°C для последующего сопоставления при подсчете с инкубированными засеянными чашками.

Подсчет колоний

После термостатирования, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания, подсчитывают количество

колоний на каждой чашке, содержащей менее 300 колоний (или менее другого количества, установленного соответствующим стандартом на конкретный метод испытания).

Примечание – в некоторых случаях подсчет колоний может быть затруднен (например, в присутствии инвазивных микроорганизмов). Эти случаи рассматриваются в соответствующих стандартах на конкретные методы испытаний.

10. Метод расчета (общий случай)

Для получения достоверных результатов при подсчете количества колоний необходимо, чтобы хотя бы в одной чашке содержалось не менее 15 колоний.

Количество микроорганизмов N в 1 г (см^3) пробы вычисляют как средневзвешенное значение из подсчетов на двух последовательных разведениях по формуле:

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d},$$

где ΣC - сумма колоний, подсчитанных на всех чашках в двух последовательных разведениях, из которых хотя бы одна чашка содержит не менее 15 колоний;

V - объем посевного материала, внесенного в каждую чашку, см^3 ;

n_1 - количество отобранных для подсчета чашек в первом разведении;

n_2 - количество отобранных для подсчета чашек во втором разведении;

d - коэффициент разбавления, соответствующий первому разведению.

Результат вычисления округляют до двух значащих цифр. Для этого, если последняя цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если последняя цифра равна или более 5, предшествующую увеличивают

на единицу. Округление проводят поэтапно до получения двух значащих цифр.

За результат принимают количество микроорганизмов в 1 см³ (жидкие продукты) или в грамме (прочие продукты), выраженное в виде числа от 1,1 до 9,9, умноженного на 10 в соответствующей степени.

ПРИМЕР

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 26}{1(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182.$$

Округление результата дает 19000 или $1,9 \times 10^4$ микроорганизмов в грамме продукта.

Метод расчета при проведении идентификации

Если используемый метод требует идентификации, определенное количество A колоний (обычно 5) пересевают с каждой чашки, отобранной для подсчета колоний. После идентификации рассчитывают для каждой чашки количество идентифицированных микроорганизмов a по формуле:

$$a = b/A \times C$$

где b - количество колоний, соответствующих критериям идентификации;

C - общее количество колоний.

Результат вычисления округляют до целого числа.

Количество N идентифицированных микроорганизмов, присутствующих в 1 г (см³) испытуемой пробы рассчитывают как средневзвешенное значение, заменив ΣC на Σa .

ПРИМЕР

Прямой подсчет жидкого продукта дал следующие результаты:

- в первом выбранном разведении (10^{-3}) в двух чашках выявлено соответственно: 66 и 80 колоний;

- во втором выбранном разведении (10^{-4}) - 4 и 7 колоний.

Результаты идентификации:

из чашки с 66 колониями для идентификации отобрано 8 колоний, из которых 6 соответствовали критериям; следовательно $a = 50$;

из чашки с 80 колониями отобрано 9 колоний, из которых 6 соответствовали критериям; следовательно $a = 53$;

из чашки с 7 колониями отобрано 5 колоний, из которых 4 соответствовали критериям; следовательно $a = 6$;

из чашки с 4 колониями все 4 идентифицированы положительно; следовательно $a = 4$.

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-3}} = \frac{113}{2,2 \cdot 10^{-3}} = 51364.$$

Таким образом, количество обнаруженных в пробе микроорганизмов составляет $5,1 \times 10^4$ в 1 см^3 .

Приближенные оценки количества микроорганизмов

Если в каждой из двух чашек содержится менее 15 колоний на уровне исходной пробы (жидкие продукты) или исходной суспензии (прочие продукты), то рассчитывают среднее арифметическое \bar{u} колоний, подсчитанных на этих чашках.

Результат выражают следующим образом:

- для жидких продуктов - приближенное количество микроорганизмов в 1 см^3 $N_E = \bar{u}$;

- для прочих продуктов - приближенное количество микроорганизмов в 1 г $N_E = \bar{u}/d$, где d - коэффициент разбавления исходной суспензии.

Если две чашки не содержат колоний на уровне исходной пробы (жидкие продукты) или исходной суспензии (прочие продукты), то результаты выражают следующим образом:

- менее 1 микроорганизма в 1 см^3 (жидкие продукты);

- менее $1/d$ микроорганизмов в 1 г (прочие продукты), где d - коэффициент разбавления исходной суспензии.

1. Метод обнаружения

Метод обнаружения - это метод, который определяет наличие или отсутствие микроорганизмов в заданном объеме продукта.

Сущность метода

Если не установлено иное в конкретных стандартах на методы испытаний, количество P испытываемого продукта смешивают (жидкие продукты) или гомогенизируют (прочие продукты) с $9 p$ см³ или г селективной или селективной жидкой среды. После термостатирования, желательно в бане с терморегулятором, распределяют бактериологической петлей выросшую культуру на поверхности селективной агаровой среды таким образом, чтобы получить изолированные колонии. После термостатирования несколько колоний (обычно пять) подвергают идентификации.

В некоторых случаях для оживления микроорганизмов, подвергшихся стрессовым воздействиям, желательно предварить обогащение селективной или селективной жидкой среды обогащением питательного бульона. Иногда имеет смысл использовать для тех же целей две или более селективные или селективные жидкие среды, а также две или более селективные агаровые среды.

Оценка результатов

Если искомый микроорганизм обнаружен, результат выражают следующим образом:

- «обнаружен, при этом указывается навеска исследуемого продукта».

Если искомый микроорганизм отсутствует, результаты выражают следующим образом:

- «не обнаружен, при этом указывается навеска исследуемого продукта».

Ни при каких обстоятельствах результат не распространяют на иное, большее количество продукта.

Лабораторная работа № 2.

Задачи микробиологических исследований, правила взятия материала для их проведения.

Цель микробиологического исследования - установить факт наличия или отсутствия возбудителя в исследуемом материале.

Задачи микробиологических исследований.

- 1. Обнаружение** патогенных бактерий в исследуемом материале.
- 2. Идентификация.** Определение видовой принадлежности патогенных бактерий, их морфологических, биохимических, токсигенных и антигенных свойств.

Методы. Разработано много методических приёмов выделения и идентификации подавляющего большинства возбудителей инфекций человека. Эффективность выделения возбудителя в значительной степени обусловлена правильной техникой отбора образцов клинического материала, своевременностью их доставки в лабораторию и их правильным хранением.

Основные правила взятия материала для проведения микробиологических исследований.

- 1. Своевременное изъятие.**
- 2. Объём материала.** Получение материала в объёме, достаточном для всего комплекса исследований.
- 3. Тампоны с мазками** помещают в транспортную среду или сохраняют во влажной атмосфере, т.к. при высыхании погибает большинство бактерий (не рекомендуется использовать натуральную вату, т.к. остатки жирных кислот в хлопковых волокнах способны угнетать рост некоторых прихотливых микроорганизмов).
- 4. Замораживание материала.** Некоторые материалы можно сохранять в замороженном виде. СМЖ, кровь и другие тканевые жидкости замораживать нельзя.

5. Анаэробы. Идеальный способ получения материала, подозрительного на анаэробы - аспирация отделяемого шприцем.

6. Сроки исследования. Исследования следует начинать немедленно после поступления образца.

Лабораторные пробы

1. Отбор проб

Очень важно, чтобы лаборатория получала пробы, которые были бы действительно представительными для продукта и не были повреждены и изменены во время транспортирования или хранения.

Отбор проб проводится в соответствии с требованиями специализированных стандартов, разработанных для рассматриваемых групп продукции.

При отсутствии специализированных стандартов отбор проб проводится по ГОСТ 26668 или по специальному соглашению между заинтересованными сторонами.

2. Транспортирование проб

При транспортировании проб в лабораторию обеспечивают их содержание в условиях, предупреждающих любые изменения количества микроорганизмов, присутствующих в них. Предпочтение отдают наиболее быстрым способам транспортирования.

Особое внимание обращают на соблюдение следующих температур при хранении нижеперечисленных продуктов:

- устойчивые продукты - температура окружающей среды;
- свежие и охлажденные продукты - от 0 до 4°C;
- продукты замороженные и глубокой заморозки - ниже минус 18°C;
- пастеризованные и аналогичные продукты - от 0 до 4°C;
- образцы испорченных устойчивых продуктов - от 0 до 4°C.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ - нестойкие пищевые продукты (например, субпродукты, свежая рыба) следует хранить при температуре от 0 до 2°C.

Образцы испорченных устойчивых продуктов должны транспортироваться в закрытых упаковках для защиты от возможного протекания.

3. Приемка и хранение проб

При поступлении проб персонал лаборатории должен проверить их состояние. Если состояние неудовлетворительное или пробы не соответствуют требованиям, лаборатория должна отбраковать их. В особых случаях можно провести испытания таких проб, но в протоколе испытаний должно быть дано обоснование полученных результатов.

Принятые лабораторией пробы документируют таким образом, чтобы их движение вплоть до составления протокола испытаний можно было проконтролировать.

Должна быть зафиксирована следующая информация:

- дата поступления пробы;
- особенности процедуры отбора проб (дата отбора, условия отбора и другие);
- имя и адрес заявителя;
- характеристики продукта.

Пробы перед исследованием хранят в условиях, предупреждающих любое изменение в количестве присутствующих микроорганизмов.

Особое внимание должно быть уделено температуре хранения и предельным срокам проведения исследований для следующих продуктов:

- устойчивые продукты - как можно быстрее, до истечения предельных сроков хранения;
- свежие и охлажденные продукты - в течение 24 ч после получения, при необходимости более длительного хранения пробы быстро замораживают это в протоколе испытаний, потому что замораживание отдельных продуктов изменяет состав микрофлоры;
- пастеризованные и аналогичные им продукты - как можно быстрее, до истечения предельных сроков хранения;

- образцы испорченных устойчивых продуктов - как можно быстрее, не более 48 ч.

4. Отбор навесок пробы

Чтобы избежать заражения окружающей среды и навески, рекомендуется работать в специальном помещении или в боксе. При их отсутствии продукты, для которых заранее известно, что они содержат мало микроорганизмов (например, пастеризованные продукты или готовые к употреблению блюда), всегда исследуют в первую очередь, и вслед за ними - более зараженные.

Защита окружающей среды от заражения особенно важна при взвешивании и приготовлении навесок проб интенсивно зараженных порошкообразных продуктов. Эту операцию следует проводить в боксе.

При отборе навесок принимают все меры по исключению любого риска их загрязнения. Для этого предпринимают следующие меры предосторожности:

- если не используют бокс, то работают вблизи открытого пламени;
- в случае упакованных продуктов очищают наружную сторону упаковки в месте ее вскрытия 70 %-ным этанолом; если возможно - фламбируют;
- любой инструмент, который применяют для вскрытия упаковки (консервный нож, ножницы и другой), должен быть стерильным;
- любой инструмент, используемый для отбора навески пробы (ложка, пинцет, пипетка и другой), должен быть стерильным;
- на пластиковый пакет, сосуд и другую емкость с навеской осторожно (аккуратно) наносят маркировку, позволяющую идентифицировать исходный образец (пробу).

5. Хранение и обеззараживание лабораторных образцов

Кроме особых случаев, лабораторные образцы сохраняют до получения всех результатов анализов, если необходимо, то и более длительное время. Образцы упаковывают в стерильные емкости или пластиковые пакеты и

хранят при температуре хранения данного продукта. Охлажденные свежие продукты хранят в замороженном виде.

Испорченные и представляющие опасность лабораторные образцы перед выбрасыванием обеззараживают. Неиспорченные лабораторные образцы выбрасывают без обработки.

Методы исследований и обработка результатов

1. Гигиенические меры предосторожности при проведении исследований

Для того, чтобы проводить работы в максимально асептических условиях, предпринимают следующие меры предосторожности:

- удостоверяются, что рабочая зона является чистой и отсутствуют сквозняки (двери и окна закрыты);
- обеззараживают рабочую поверхность до и после работы подходящим дезинфицирующим средством;
- перед началом работы удостоверяются в том, что все необходимое для ее проведения, имеется в наличии;
- при проведении работ в стерильном боксе используют стерильные перчатки или перед началом работы обеззараживают руки (например, смесью высокомолекулярных спиртов), в процессе работы избегают скрещивания рук;
- при работе вне стерильного бокса открывают пробирки и флаконы в зоне пламени, удерживая их в максимально наклоненном положении;
- работу выполняют как можно быстрее, избегая ненужных движений;
- если в ходе исследований содержимое бокса с пипетками, чашками Петри и т. д. не используют целиком, то после изъятия нужного количества предметов бокс надежно закрывают;
- стерилизуют петли и иглы в пламени до и после употребления; чтобы избежать разбрызгивания веществ и микроорганизмов, используют прокаливатель; при любой возможности применяют одноразовые пипетки и иглы;

- перед обеззараживанием использованные пипетки, шпатели и т. д. помещают в специальные сосуды, содержащие подходящее дезинфицирующее средство (например пипетки помещают в раствор гипохлорита натрия);

- перед обеззараживанием чашки Петри, питательные среды и прочее оборудование, которое может содержать микроорганизмы, помещают в специальные контейнеры, затем подвергают мойке;

- перед обеззараживанием или сжиганием одноразовое оборудование помещают в подходящие контейнеры;

- немедленно удаляют любые брызги зараженных и других продуктов с помощью ватных тампонов или других подходящих материалов, смоченных 70 %-ным этанолом или другим дезинфицирующим средством; перед продолжением работы моют и дезинфицируют рабочую поверхность.

Обращение с продуктами, предположительно зараженными патогенными бактериями (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* и т.д.) или токсинами, требует особых мер предосторожности, которые приведены в нормативных документах по безопасности проведения работ в микробиологических лабораториях.

Рекомендуемые меры предосторожности:

- все этапы исследования должны проводиться в стерильном боксе;
- запрещается наполнять пипетки путем засасывания ртом, для этой цели необходимо использовать резиновую грушу или другое механическое устройство.

Аэрозоли являются основной причиной заражения окружающей среды и инфицирования. Аэрозоли образуются при:

- открытии чашек Петри, пробирок и флаконов;
- использовании смесителей, шприцов, центрифуг и т. д.;
- опорожнении пипеток выдуванием;
- стерилизации петель и игл после влажной инокуляции;

- открытия ампул, содержащих лиофилизированные культуры микроорганизмов.

Лабораторная работа № 3.

Микроскопия материала.

Микробиологическое исследование, как правило, начинается с микроскопии материала и его последующего посева на питательные среды.

Для **световой микроскопии** применяют **микроскоп** - оптический прибор, позволяющий наблюдать мелкие объекты (рис. 3).

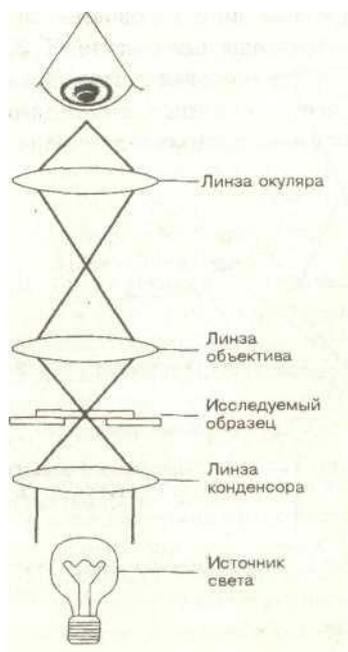


Рисунок 3. Принципиальная схема светового микроскопа.

Увеличение изображения достигается системой линз объектива и окуляра. Источник света (непосредственно или чаще с помощью зеркала) и конденсор с диафрагмой направляют световой поток и регулируют освещение объекта. Между зеркалом и конденсором располагается **апертурная (ирис)диафрагма Дейвиса**, регулирующая апертуру (светосилу) конденсора. Первичное увеличение изображения даёт линза объектива, вторичное - линза окуляра; **общее увеличение - произведение увеличивающей способности обеих линз**. Механическая часть микроскопа

включает штатив, предметный столик, макро- и микрометрический винты, тубус, тубусодержатель. **Предел разрешения** светового микроскопа определяется длиной световой волны и апертурой линз. Теоретически возможный предел разрешения светового микроскопа равен 0,2 мкм (минимальное расстояние, на котором различимы два объекта); разрешение микроскопа можно повысить за счёт увеличения апертуры оптической системы, например, путём увеличения коэффициента преломления.

Коэффициент преломления (иммерсии) жидких сред больше коэффициента преломления воздуха ($n = 1,0$), при микроскопировании применяют несколько иммерсионных сред: масляную, глицериновую, водную. Объектив микроскопа состоит из нескольких стеклянных линз: первая (сферическая или полусферическая) предназначена для получения увеличенного изображения, остальные корректируют оптические артефакты (абберации). Фокусное расстояние линзы для лучей разной длины волны различно. Поэтому при использовании монохроматического света формируемое линзой изображение предмета имеет окрашенные края. Подобный феномен известен как **хроматическая абберация**; её устраняют ахроматические и апохроматические объективы. Различие оптических свойств центральной и периферической частей сферической линзы обуславливает **сферические абберации**; их устраняют апохроматические объективы. Сферическая линза не позволяет одновременно фокусировать изображение по всему полю. Для устранения этого недостатка применяют специальные объективы - планахроматы и планапохроматы. Наилучшим объективом считают планапохромат с высокой числовой апертурой.

Темнопольная микроскопия позволяет наблюдать живые бактерии (рис. 4). Для этого используют темнопольный конденсор, выделяющий контрастирующие структуры неокрашенного материала. Перед началом работы свет устанавливают и центрируют по светлomu полю, затем светлопольный конденсор удаляют и заменяют соответствующей системой

(например, ОИ-10 или ОИ-21). Препарат готовят по методу «раздавленной капли», делая его как можно более тонким (толщина предметного стекла не должна быть толще 1 мм). Наблюдаемый объект выглядит как освещенный на тёмном поле. При этом лучи от осветителя падают на объект сбоку, а в линзы микроскопа поступают только рассеянные лучи (реостат осветителя следует выключить). В качестве иммерсионной жидкости вполне пригодно вазелиновое масло.

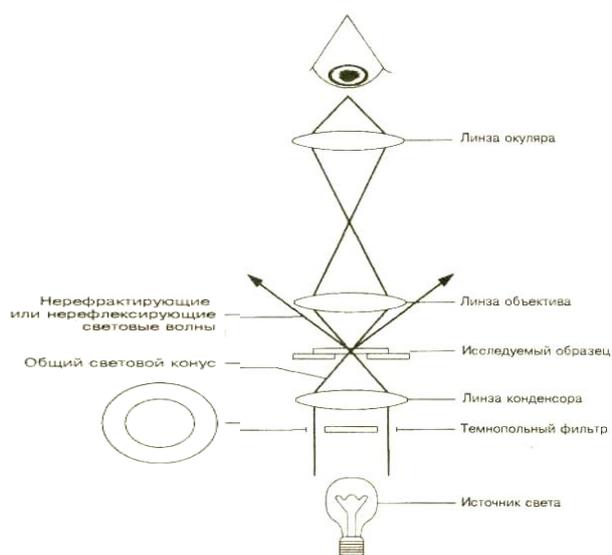


Рисунок 4. Схема светового микроскопа с темнопольным конденсором.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые и неокрашенные объекты за счёт повышения их контрастности. При прохождении света через окрашенные объекты изменяется амплитуда световой волны, а при прохождении через неокрашенные - фаза световой волны, что и используют для получения высококонтрастного изображения в фазово-контрастной (рис. 5) и интерференционной микроскопии. Для повышения контрастности фазовые кольца покрывают металлом, поглощающим прямой свет, не влияя на сдвиг фазы. В оптической системе микроскопа применяют специальный конденсор с револьвером диафрагм и центрирующим устройством; объективы заменяют на иммерсионные объективы-апохроматы.

Поляризационная микроскопия позволяет получать изображения неокрашенных анизотропных структур (например, коллагеновых волокон и миофибрилл); **интерференционная микроскопия**, объединяющая принципы фазово-контрастной и поляризационной микроскопии, применяется для получения контрастного трёхмерного изображения неокрашенных объектов. Специальная интерференционная оптика (**оптика Номарского**) нашла применение в микроскопах с дифференциальным интерференционным контрастом.

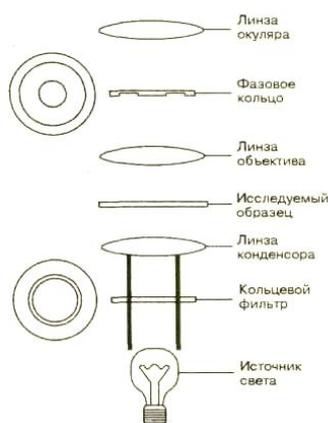


Рисунок 5. Принципиальная схема работы фазово-контрастного микроскопа.

Люминесцентная микроскопия применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. Обычно исследуемые микроорганизмы окрашивают флюоресцирующими красителями (флюоресцеин, родамин и др.) непосредственно либо с помощью меченных таким красителем АТ или лектинов, взаимодействующих с Аг или другими связывающими лиганд структурами объекта. В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два фильтра: первый задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца; второй пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом и воспринимаемый глазом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра (рис.6).

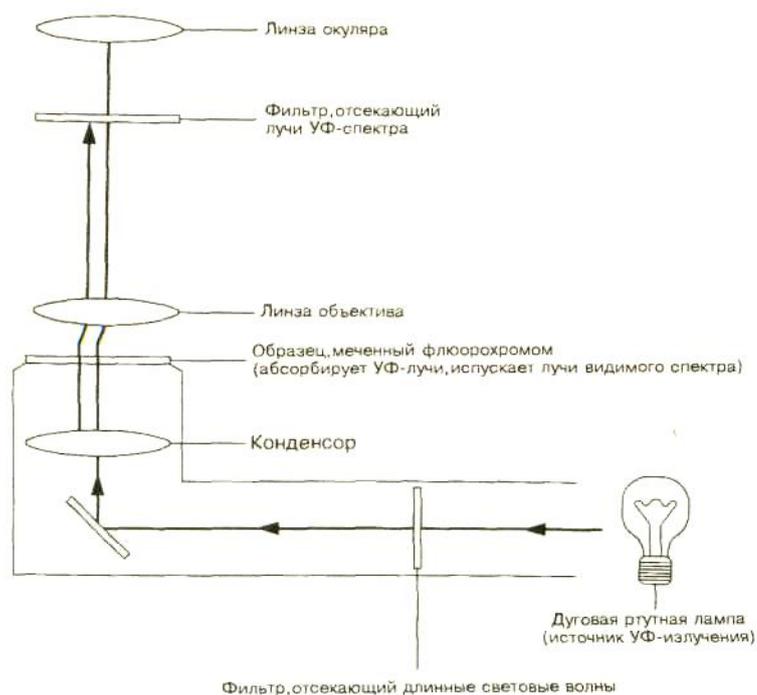


Рисунок 6. Принципиальная схема люминесцентного микроскопа.

Имунофлюоресцентные методы. Люминесцентная микроскопия нашла широкое применение для визуализации результатов иммунохимических реакций, основанных на специфическом взаимодействии меченных флюоресцирующими красителями АТ с Аг изучаемого объекта. АТ метят различными способами: флюорохромами (флюоресцеин, родамин и др.), при помощи ферментной реакции (пероксидаза хрена) или электроноплотными частицами (ферритин, коллоидное золото). Варианты иммунофлюоресцентных реакций представлены на рис. 7 и 8.

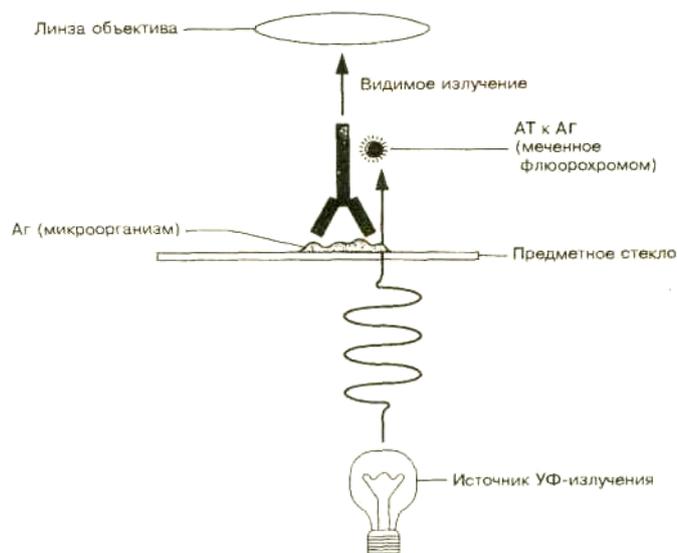


Рисунок 7. Метод прямой иммунофлюоресценции. Прямой метод предполагает использование меченных флюоресцирующим красителем АТ к интересующему Аг; АТ взаимодействуют с Аг в местах их локализации, что и визуализирует метка.

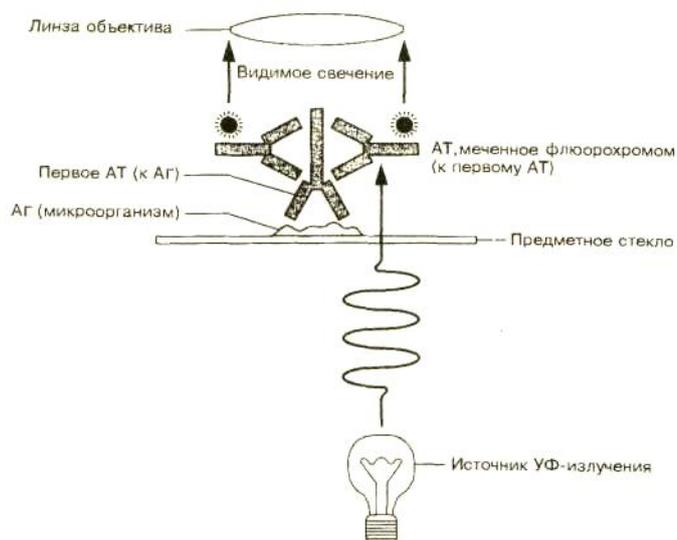


Рисунок 8. Принципиальная схема метода непрямой иммунофлюоресценции. Непрямой метод предполагает использование двух различных АТ. Первые АТ реагируют с Аг микроорганизма, вторые АТ (связанные с меткой) специфически взаимодействуют с первыми АТ, являющимися Аг ко вторым АТ. Метод значительно чувствительнее прямого, т.к. с каждой молекулой первых АТ связывается несколько молекул вторых АТ.

Электронная микроскопия. Теоретически разрешение просвечивающего электронного микроскопа составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных микроскопов приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм.

1. Просвечивающий электронный микроскоп (рис. 9) состоит из колонны, через которую в вакууме проходят электроны, излучаемые катодной нитью.

Пучок электронов, фокусируемый кольцевыми магнитами, проходит через подготовленный образец. Характер рассеивания электронов зависит от плотности образца. Проходящие через образец электроны наблюдают на флюоресцирующем экране и регистрируют при помощи фотопластинки.

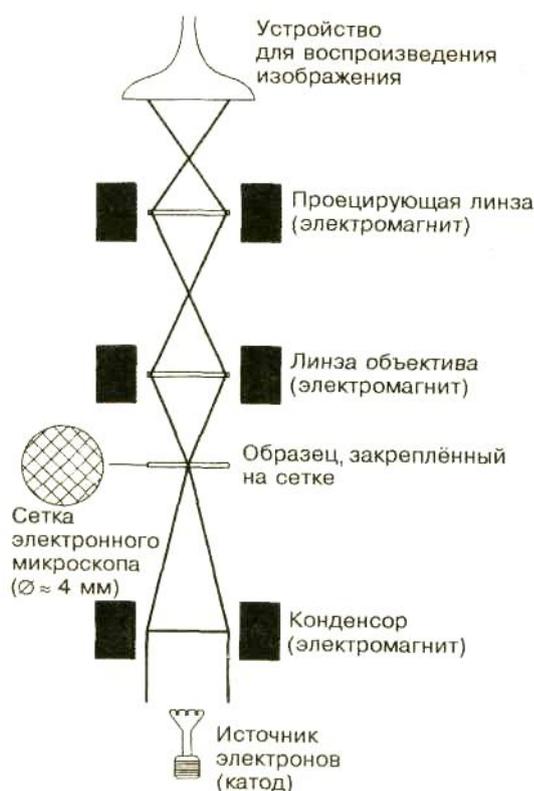


Рисунок 9. Принципиальная схема электронного микроскопа.

2. Сканирующий электронный микроскоп применяют для получения трёхмерного изображения поверхности исследуемого объекта.

3. Метод сколов (замораживание-скалывание) применяют для изучения внутреннего строения клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота (-196°C) в присутствии криопротектора и

используют для изготовления сколов. Плоскости скола проходят через гидрофобную середину двойного слоя липидов. Обнажённую внутреннюю поверхность мембран оттеняют платиной, полученные реплики изучают в сканирующем электронном микроскопе.

Другие методы визуализации

1. Компьютерная интерференционная микроскопия позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур.

2. Лазерная конфокальная микроскопия даёт возможность получить отчётливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. При сочетании с компьютерной техникой возможна **пространственная реконструкция** изучаемого объекта.

3. Для решения специальных задач применяются **МРТ-интроскопия, позитронная эмиссионная томография, рентгеновская микроскопия** (позволяет наблюдать объекты не в вакууме, а в обычных условиях).

В бактериологической практике микроскопически исследуют **неокрашенные образцы** (нативный материал) и **окрашенные препараты** (мазки или мазки-отпечатки), приготовленные из клинического материала или колоний выросших микроорганизмов.

Нативные препараты.

Используют для исследования живых неокрашенных бактерий, определения подвижности микроорганизмов, диагностики сифилиса и предварительной диагностики диарей, вызванных кампилобактерами. Применяются **метод висячей капли, микрокамеры с плотными средами, негативные методы исследования живых бактерий, исследование в тёмном поле и фазово-контрастная микроскопия.**

Окрашенные препараты.

Для приготовления окрашенных препаратов исследуемый объект предварительно подвергают фиксации.

1. Фиксация.

В практической бактериологии применяют несколько способов фиксации. Наиболее распространенные:

термическая фиксация (над пламенем горелки) - метод достаточно грубый, но сохраняет морфологию и отношение к красителям у бактерий;

фиксирующие растворы такие как: **формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнуа, ацетон, пары осмиевой кислоты** и др. – используются в светооптической микроскопии; **глутаральдегид и тетраоксид осмия** - для электронной микроскопии. Фиксирующие растворы применяют для более детального изучения структуры клеток, метод основан на предотвращении ферментативного аутолиза бактерий и стабилизации макромолекул путём химического их сшивания. Мазки фиксируют, помещая их в раствор фиксатора или нанося его на мазок.

2. Окрашивание.

Цвета окрашивания:

красные - основной фуксин (парарозанилин), кислый фуксин, сафранин, конго красный.

фиолетовые - генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, фиолетовый *Лаута* (далия).

синие - метиленовый синий, толуидиновый синий и водный синий.

зелёные - малахитовый и бриллиантовый зелёные.

В практической бактериологии используют:

стандартные красители - карболовый фуксин *Циля*, фуксин *Пфайффера* и метиленовый синий по *Лёффлеру*;

кислые красители (например, эозин, конго красный) связываются со структурами или веществами, имеющими щелочную реакцию (например, с цитоплазматическими белками);

щелочные красители (например, гематоксилин, метиленовый синий, толуидиновый синий, аzur) связываются с базофильными (кислыми) компонентами ткани (например, с нуклеиновыми кислотами ядра и рибосомами);

часто прибегают к помощи стандартных **смесей кислых и щелочных красителей** (например, гематоксилин и эозин).

Для электронной микроскопии материал контрастируют солями тяжёлых металлов (**цитрат свинца** и **уранилацетат**).

Для светоптической микроскопии основными являются **специальные и дифференцирующие методы окраски**. Специальные методы: окраска по *Граму*, *Цилю-Нильсену*, *Киньону*. Дифференцирующими называют методы окраски хроматиновых (ядерных) и метакроматиновых (волютиновых) элементов бактериальной клетки. Наиболее употребимы окраски по *Майеру*, *Романовскому-Гимзе* и *Пекарскому*.

Для окраски **капсул** бактерий обычно применяют методы *Хисса*, *Лейфсона* и *Антони*, последний наиболее прост и включает окраску кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой 20% водным раствором CuSO_4 .

Для окраски **жгутиков** предложены методы *Лёффлера*, *Бэйли*, *Грея* и др. Для всех методов характерны первоначальное протравливание препарата [обычно растворами танина, $\text{KA1}(\text{SO}_4)_2$, HgCl_2] и последующая окраска (чаще карболовый фуксин *Циля*).

Окраску **спор** бактерий проводят после предварительной обработки их стенок. Наиболее простой способ - кипячение суспензии спор с красителем в пробирке или на предметном стекле.

Цель работы.

1. Выявление возбудителя в клиническом материале.
2. Ориентировочная идентификация бактерий в исследуемом образце.
3. Определение некоторых морфологических признаков бактерий (например, капсул, зёрен волютина и т.д.).
4. Изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

Ход работы.

1. Исследование микроорганизмов в окрашенном состоянии

Окрашенные тела микроорганизмов резко отличаются от общего фона препарата, что позволяет установить: а) ориентировочно состав микробного пейзажа изучаемого объекта; б) степень чистоты выделяемой культуры; в) некоторые морфологические особенности микроорганизмов (форма, размеры, наличие спор, жгутиков, капсул).

Приготовление окрашенного препарата состоит из нескольких последовательных операций: подготовки мазка, высушивания, фиксации, окраски. Для этого используют совершенно чистые обезжиренные стекла. Наиболее простой способ обезжиривания состоит в натирании предметного стекла кусочком сухого мыла, а затем протирании чистой марлей. Капля воды, нанесенная на хорошо подготовленную поверхность, легко расплывается.

При взятии бактериальной культуры поступают следующим образом:

1) нагревают до покраснения бактериологическую петлю в пламени; петлю держат в правой руке за петледержатель;

2) берут пробирку с культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность питательной среды; вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянным пальцем правой руки к ладони;

3) обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут материал;

4) вынимают петлю, обжигают край пробирки, закрывают ее пробкой.

Если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора или стерильной водопроводной воды.

5) взятый материал осторожно круговыми движениями распределяют по стеклу ровным тонким слоем, после чего петлю немедленно стерилизуют в пламени. **Следует помнить, что в этот период происходит работа с живыми микроорганизмами, поэтому резкие движения могут привести к разбрызгиванию материала и повлечь за собой инфицирование рук и окружающих предметов.**

Для приготовления мазка из гноя или мокроты используют стерильные препаровальные иглы, с помощью которых кусочки субстрата помещают на середину предметного стекла, вторым стеклом покрывают сверху. Прижав одно стекло к другому, растирают материал, пока не получат тонкий мазок.

Препарат крови готовят по следующей методике: предметным стеклом, отступя 1-2 см от края, прикоснуться к капле крови, выступившей после укола. Быстро, чтобы кровь не свернулась, ребром шлифованного стекла распределить ее по всей поверхности.

6) мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем. Нельзя допускать перегрева, т.к. при этом может нарушиться структура микроорганизмов.

7) фиксацией мазка преследуется двоякая цель - микроорганизмы погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла, не смываясь при дальнейшей обработке. Наиболее распространенным способом является фиксация в пламени. Предметное стекло (мазком вверх) троекратно проводят через пламя. При таком способе фиксации сохраняются форма бактерий, споры, зерна волютина, однако способ нельзя применять для мазков крови, мазков-отпечатков из органов, а также при выявлении спор и жгутиков. Для этих целей проводят фиксацию в этиловом спирте (20 мин), в жидкости Никифорова, состоящей из смеси равных объемов этилового спирта и эфира (20 мин), в холодном ацетоне.

Существуют простые и сложные методы окраски. При применении простых методов можно использовать только одну краску - водный фуксии (1-2 мин) или метиленовый синий (3-5 мин).

8) по окончании окрашивания препарат промывают струей воды до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной, и сушат его на воздухе при комнатной температуре или осторожно промокая фильтровальной бумагой.

Сложные методы окраски предусматривают последовательное использование нескольких красителей различного химического состава, что позволяет выявить определенные структуры бактериальной клетки.

Окраска по Граму

Методика: 1) окрасить мазок генцианвиолетом (2 мин, через фильтровальную бумагу); 2) бумагу удалить, оставшуюся краску слить; 3) окрасить мазок раствором Люголя (1 мин); 4) раствор Люголя слить и нанести несколько капель чистого 96% спирта (30-40 с осторожно покачивать стекло); 5) тщательно смыть спирт водой; 6) окрасить водным фуксином (2 мин); 7) промыть водой и высушить.

Все бактерии по отношению к окраске по Граму делятся на грамположительные - темно-фиолетового цвета и грамотрицательные - красного. Способность окрашиваться в тот или другой цвет зависит от их химического состава. У грамположительных бактерий в клеточной стенке отсутствуют ароматические и серосодержащие аминокислоты, отмечается низкое содержание липидов, у грамотрицательных, напротив, эти вещества содержатся в большом количестве. Кроме того, у грамположительных бактерий имеется магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, отсутствующая у грамотрицательных. Она и образует прочный химический комплекс с белком, генцианвиолетом и йодом, который не разрушается при кратковременном действии спирта. У грамотрицательных такой комплекс не образуется. Они легко обесцвечиваются под действием спирта. Успех окраски зависит от ряда причин и прежде всего от

правильности обработки спиртом. При длительном его воздействии краска может быть вымыта и из грамположительных бактерий. В таком случае в ходе дополнительной окраски фуксином они примут красный цвет. Слишком кратковременное действие спирта не позволит выявить грамотрицательные бактерии.

Окраска кислотоустойчивых бактерий

Кислотоустойчивые микроорганизмы обладают выраженной устойчивостью к неорганическим кислотам, спиртам и щелочам. Это связано с наличием в клеточной стенке и цитоплазме сравнительно большого количества липидов (воскоподобных веществ). Бактерии этой группы очень плохо окрашиваются обычными красками, поэтому применяют концентрированные растворы красок с подогревом. При последующей кратковременной обработке кислотой тела микробных клеток, воспринявшие краску, не обесцвечиваются. Это позволяет отличить кислотоустойчивые бактерии от не обладающих этим свойством. Их окрашивают по методу Циля - Нельсена, разработанному с учетом всех указанных особенностей.

Окраска по методу Циля - Нельсена

Методика: 1) нанести несколько капель карболового фуксина на фиксированный мазок, покрытый фильтровальной бумагой, и подогреть до появления паров (3-5 мин); 2) бумагу сжать, мазок охладить и обесцветить 5% серной кислотой или 3% солянокислым спиртом (2-4 с); 3) тщательно промыть водой; 4) окрасить леффлеровской синькой (3-5 мин); 5) промыть водой и высушить.

Кислотоустойчивые бактерии в результате такой окраски становятся рубиново-красными, а остальные - синими.

Окраска спор

Некоторые виды бактерий образуют внутриклеточные (эндогенные) споры. В отличие от вегетативной клетки они обладают меньшим

количеством свободной воды, а также высоким содержанием липидов и кальция.

Зрелая спора с трудом поддается окрашиванию из-за малой проницаемости оболочки. При окраске по Граму спорообразующей культуры краска воспринимается только вегетативной частью микробной клетки, а спора остается бесцветной. Проницаемость ее оболочки резко увеличивается после обработки горячей соляной кислотой или при использовании концентрированного раствора краски с подогревом. Восприняв краску, спора при последующей обработке кислотой не обесцвечивается, в то время как вегетативные клетки немедленно отдают краску.

Окраска спор по методу Ожешко

Методика: 1) нанести несколько капель 0,5% соляной кислоты на нефиксированный мазок и нагреть до появления паров (2-3 мин); 2) слить кислоту, промыть водой, высушить; 3) зафиксировать в пламени; 4) окрасить по методу Циля - Нельсена (при этом споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные формы - в синий). Часто для окраски спор используют только метод Циля - Нельсена.

Окраска включения волютина

Волютин - производное нуклеиновой кислоты - играет роль запасного питательного вещества. Среди включений запасного характера - жиры, гликоген, волютин, который занимает особое место. На основании его присутствия и особого расположения в клетке ставят предварительный диагноз методом бактериоскопии при подозрении на дифтерию. Наиболее демонстративные результаты удается получить при окраске зерен волютина по методу Нейссера.

Методика: 1) окрасить мазок уксуснокислой синькой Нейссера (2-3 мин); 2) промыть; 3) окрасить раствором Люголя (30 с); 4) слить раствор Люголя и окрасить везувином (1 мин); 5) промыть препарат и высушить.

Цитоплазма клетки, имеющая кислую реакцию, воспринимает щелочной краситель везулин и приобретает желтый цвет. Зерна волютина, прочно фиксировавшие ацетат цинка - темно-синие, почти черные.

Обнаружение капсул у бактерий

Некоторые микробы обладают способностью откладывать на поверхности своего тела мощный слизистый слой вокруг клеточной стенки, его называют капсулой. В состав капсул входят, главным образом, полисахариды (пневмококк), но у некоторых они содержат и полипептиды (сибиреязвенная палочка). Капсулы имеют консистенцию геля, поэтому при микроскопии живых бактерий они видны очень плохо. Для их обнаружения применяют негативную окраску. Все перечисленные методы относятся к позитивным, т.к. при их использовании окрашиваются микробные клетки. При негативных способах краситель заполняет пространство вокруг бактерий, в результате чего они выглядят светлыми частицами на темном фоне.

Обнаружение капсул по методу Бурри

Методика: 1) смешать на предметном стекле немного капсульной культуры и каплю разведенной (1:9) туши; приготовить тонкий мазок; 2) высушить на воздухе и бактериоскопировать. На темном фоне хорошо видны бесцветные капсулы.

Модификация по Бурри - Гинсу включает создание фона краской конгорот, последующую фиксацию в 5% растворе HCl и дополнительную окраску водным фуксином. В результате - общий фон темного цвета, капсулы - бесцветные, а тела бактерий - красные.

Окраска по Романовскому - Гимзе

Относится к сложным методам и применяется чаще всего для мазков-отпечатков из органов или мазков крови после фиксации в жидком фиксаторе. Позволяет выявить ядерные элементы бактериальных клеток и гранулы волютина. Для окраски берут каплю готовой краски на 1 мл воды, которая должна быть подщелочена до pH 7,2.

Методика: 1) поместить препарат (мазком вниз) в чашку Петри, подложив под края стекла спички или кусочки предметных стекол; 2) подлить краску сбоку так, чтобы она без пузырей подтекла под мазок (красить 1-24 ч); 3) промыть водой (рН 7,2) и высушить. Протоплазма молодых клеток окрашивается в сине-фиолетовый цвет, ядерные элементы - в красно-фиолетовый.

1. Исследование микроорганизмов в живом состоянии.

В живом состоянии микроорганизмы исследуют с целью выявления их формы, подвижности или определения прижизненной внутренней структуры. Изучают нативные и окрашенные препараты, используя методы "раздавленной" или "висячей" капли.

Прижизненная (витальная) окраска. Взвесь микроорганизмов вносят в каплю 0,001% раствора метиленового синего или нейтрального красного. Затем готовят препарат "раздавленная" или "висячая" капля и микроскопируют его.

Приготовление препарата "раздавленная" капля. На центр обезжиренного предметного стекла наносят каплю жидкой бульонной культуры. Если культура выращивалась на плотной питательной среде, то на стекло наносят каплю стерильного изотонического раствора натрия хлорида, затем петлей прикасаются к культуре и приставшие к ней бактерии размещают в приготовленной капле. Можно заранее приготовить взвесь микроорганизмов в изотоническом растворе и взять каплю из нее. На исследуемый материал накладывают покровное стекло так, чтобы не было пузырьков воздуха. Каплю надо брать такой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклами и не выступала за края покровного. Препарат можно рассматривать как с сухими системами, так и с иммерсионной. Микроскопируют, используя объективы 40х или 90х. Очень хорошие результаты получают, применяя темнопольное или фазово-контрастное устройство. Препараты быстро высыхают, поэтому, если их приходится рассматривать не тотчас, а спустя некоторое время, их помещают во влажную камеру (чашку Петри), на дно которой положено 2-3 влажных кружка фильтровальной бумаги,

покрытых двумя сухими. Во избежание высыхания препарата и вызываемого конвекцией турбулентного движения жидкости подобные препараты можно герметизировать. Для этой цели следует пользоваться парафиновым маслом, смесью равных частей парафина и вазелина или лаком для ногтей.

В центре влажного препарата быстро возникает недостаточность кислорода, именно это помогло Пастеру открыть анаэробный обмен, в частности он отмечал, что облигатные анаэробы сохраняли подвижность только в центре, но не по краям.

Подвижные микроорганизмы иногда могут адсорбироваться на стекле; в таких случаях подвижность легче наблюдать в "висячей" капле.

Приготовление препарата "висячая" капля. Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной взвеси. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки, в результате чего стекла склеиваются. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. Получается герметически закрытая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно приготовленном препарате капля свободно висит над лункой, не касаясь ее дна или края. Микроскопируют со стороны покровного стекла, причем вначале следует найти край на малом увеличении и при суженной диафрагме, используя сухой объектив 8х, затем на большом и продолжить наблюдение (рис.10).

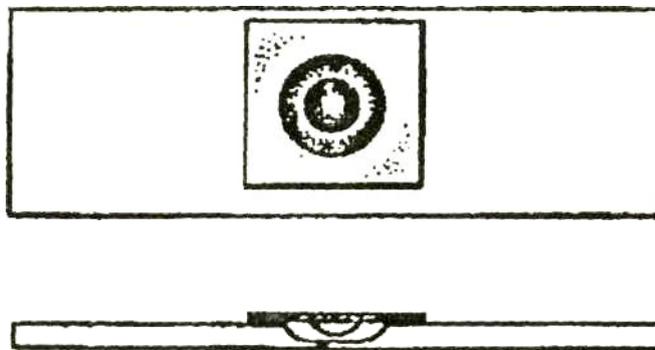


Рисунок 10. Препарат висячей капли.

При изучении подвижности микроорганизмов необходимо отличать истинную подвижность от броуновского движения, которое является следствием ударов о бактерии движущихся в растворе молекул и выявляется в виде колебаний. Многие подвижные микроорганизмы движутся очень быстро, что затрудняет точное наблюдение. Добавляя к суспензии микроорганизмов метилцеллюлозу, можно уменьшить скорость их движения и создать условия, при которых движение жгутиков становится видимым.

Недостатком метода является наличие ряда оптических дефектов, связанных с кривизной лунки, что препятствует получению высококачественных микрофотографий, а также невозможность использования темнопольного и фазово-контрастного устройств из-за большой толщины предметных стекол с лунками.

Приготовление красок

Фуксин готовят в виде концентрированного раствора Циля. Раствор обладает большой стойкостью при хранении. Его применяют при сложных методах окраски (окраска спор, кислотоустойчивых бактерий). Для простого окрашивания используют фуксин Пфейффера (фуксин Циля, разведенный в 10 раз дистиллированной водой). Он нестойк и готовят его для работы на один день.

Морфология и структура бактерий

Бактерии - одноклеточные микроорганизмы. Они имеют разнообразную форму и довольно сложную структуру, определяющую многообразие их функциональной деятельности. Для бактерий характерны четыре основные формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная), извитая и нитевидная (рис. 11).

Бактерии шаровидной формы – кокки - в зависимости от плоскости деления и расположения отдельных особей подразделяются на микрококки (отдельно лежащие кокки), диплококки (парные кокки), стрептококки (цепочки кокков), стафилококки (имеющие вид виноградных гроздьев),

тетракокки (образования из четырех кокков) и сарцины (пакеты из 8 или 16 кокков).

Палочковидные бактерии располагаются в виде одиночных клеток, дипло- или стрептобактерий. Извитые формы бактерий - вибрионы и спираиллы, а также спирохеты.

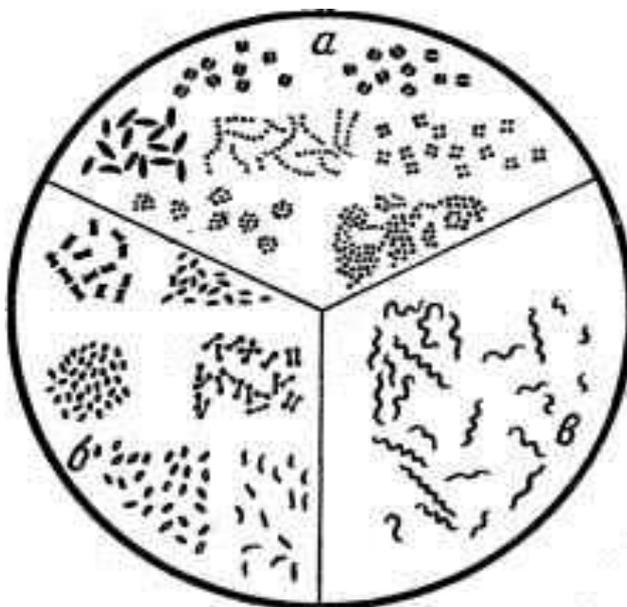


Рисунок 11. Формы бактерий: *a*- шаровидные; *б* – палочковидные; *в* – извитые.

Вибрионы имеют вид слегка изогнутых палочек, спираиллы - извитую форму с несколькими спиральными завитками.

Размеры бактерий колеблются от 0,1 до 10 мкм. В состав бактериальной клетки входят капсула, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана и цитоплазма, в которой содержатся нуклеоид, рибосомы и включения. Некоторые бактерии снабжены жгутиками (рис. 12) и ворсинками. Ряд бактерий образуют споры, которые располагаются терминально, субтерминально или центрально (рис. 13); превышая поперечный размер клетки, споры придают ей веретенообразную форму.

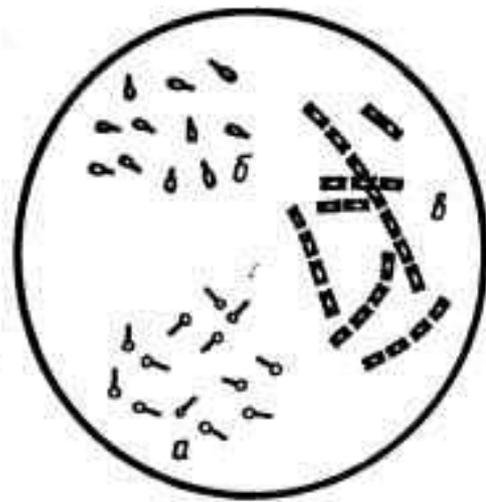
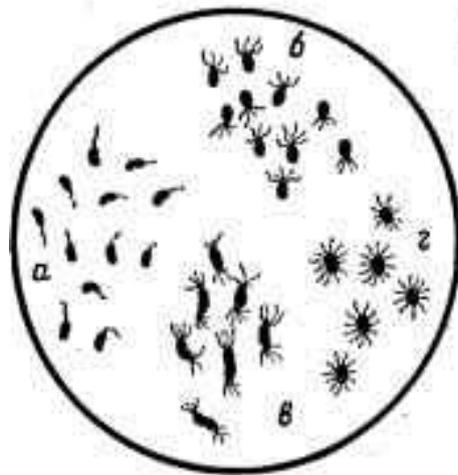


Рисунок 12. Жгутики бактерий Рисунок 13. Споры бактерий (схема): *а* – (схема): *а* – монотрих; *б* – терминальное расположение; *б* – лототрих; *в* – амфитрих; *г* – субтерминальное; *в* – центральное. перитрих.

Клеточная стенка (КС) важный и обязательный элемент для большинства прокариотных клеток. В зависимости от строения КС прокариоты делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки (рис. 14).

КС *грамположительных бактерий* содержат в качестве основных компонентов три типа макромолекул: пептидогликаны, тейхоевые кислоты, липотейхоевые кислоты. КС грамотрицательных эубактерий намного сложнее, в ее состав входит большое число макромолекул разного химического типа. У *грамотрицательных бактерий* обнаружен дополнительный внешний слой – наружная клеточная мембрана. Пространство между цитоплазматической и наружной мембранами получило название – периплазматического.

Грамотрицательные бактерии не окрашиваются кристаллическим фиолетовым при окрашивании по Граму. В отличие от грамположительных бактерий, которые сохраняют фиолетовую окраску даже после промывания обесцвечивающим растворителем (спирт), грамотрицательные полностью обесцвечиваются. После промывания растворителем при окрашивании

по Граму добавляется контрастный краситель (обычно сафранин), который окрашивает всех грамотрицательных бактерий в красный или розовый цвет. Это происходит из-за наличия внешней мембраны, препятствующей проникновению красителя внутрь клетки. Сам по себе тест полезен при классификации бактерий и разделении их на две группы относительно строения их клеточной стенки. Из-за своей более мощной и непроницаемой клеточной стенки грамотрицательные бактерии более устойчивы к антителам, чем грамположительные.

Обычно патогенность грамотрицательных бактерий связывают с определёнными компонентами их клеточных стенок, а именно, с липополисахаридным слоем (ЛПС или эндотоксический слой). В человеческом организме ЛПС вызывает иммунный ответ, который характеризуется синтезом цитокинов и активацией иммунной системы. Обычной реакцией на синтез цитокинов является воспаление, что также может привести к увеличению количества токсичных веществ в организме хозяина.

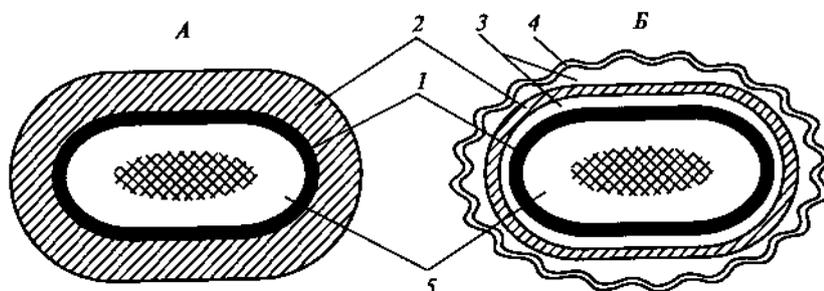


Рисунок 14. Клеточная стенка грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий: 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – пептигликан; 3 – периплазматическое пространство; 4 – наружная мембрана; 5 – цитоплазма, в центре которой расположена ДНК.

Лабораторная работа № 4.

Культивирование микроорганизмов и биохимические методы индикации бактерий

Питательные среды.

Для выделения чистых культур патогенных бактерий применяют оптимальные питательные среды с фиксированным рН. Большинство бактерий способно расти на различных питательных средах; исключения составляют хламидии и риккетсии (кроме представителей рода *Bartonella*), не растущие *in vitro* вне клеточных культур.

Компоненты питательных сред. Для натуральных питательных сред используют животные, растительные и микробные продукты: мясо, рыбную муку, молоко, яйца, кровь, картофель, дрожжи и др. Из них готовят полуфабрикаты: настои и экстракты (мясная вода, дрожжевой экстракт), ферментативные и кислотные гидролизаты (пептон, перевар Хоттингера, перевар казеина и др.). Настои и экстракты являются источником факторов роста; гидролизаты - источником аминокислот и других органических питательных веществ. Минеральные соли вносят в следующих соотношениях: NaCl - 5,0 г/л; K_2HPO_4 - 0,2-0,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1-0,2 г/л; остальные соли - 0,001 г/л. Для специальных сред используют: сахара (глюкозу, лактозу - 0,5-1,0%); многоатомные спирты (маннит, инозит и др. - 0,5-1,0%); аминокислоты - 0,5-1,0%; витамины - 0,001 мг/л; кровь - 5-10%; сыворотку крови - 10-30%; молоко и др. Из индикаторов рН чаще применяют индикатор Андрее (0,5 г кислого фуксина; раствора 1N NaOH - 17 мл; дистиллированной воды - 100 мл) или индикатор Кларка (1,5% спиртового раствора фенолового красного, метиленового красного, бромтимолового синего и др.). В качестве уплотнителя питательных сред используют агар-агар или желатин. Агар-агар - полисахарид, получаемый из морских водорослей - способен образовывать в воде гель, плавящийся при 80-86°C и застудневающий при 40-45°C: не расщепляется большинством видов микроорганизмов. Желатин - белок, получаемый из

кожи и костей; желатиновый гель плавится при 32-34°C, застудневает при 26-28°C (т.е. при температуре инкубации 37°C находится в жидком состоянии); расщепляется многими видами микроорганизмов. По этому желатин применяют редко.

Этапы приготовления питательных сред. Согласно прописи питательной среды в дистиллированную воду вносят необходимые компоненты и растворяют при нагревании. При разведении белковых гидролизатов концентрация аминного азота должна оставлять 1,0-1,2 г/л, общего - 2,5-3,0 г/л; рН среды определяют с помощью индикаторных бумажек или электропотенциометров (с учетом того, что после стерилизации рН среды снизится на 0,2). Фильтруют жидкие и желатиновые среды через фильтровальную бумагу; среды с агаром (в горячем состоянии) - через ватно-марлевый фильтр. При необходимости осветляют питательную среду обработкой белком куриного яйца, сывороткой или осаждением. Разливают среду в колбы, флаконы, пробирки. Используют чистую нестерильную посуду, если среда подлежит стерилизации при 120°C или стерильную посуду, если среда требует стерилизации текучим паром (100°C), или при 112°C. Закрывают посуду со средой ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками. В зависимости от состава среды стерилизуют различными способами. Агаровые среды, не содержащие углеводов и нативного белка, а также синтетические среды стерилизуют в автоклаве при 115-120°C в течение 15-20 мин. Среда, содержащие углеводы, молоко, желатин, стерилизуют текучим паром при 100°C дробно или в автоклаве при 112°C в течение 15 мин. Среда, содержащие нативный белок, мочевины, стерилизуют фильтрованием или добавляют стерильные компоненты (кровь, сыворотку и др.) в стерильную основу среды. Готовые стерильные питательные среды подвергают контролю на стерильность путем выдерживания в термостате при 37°C в течение 1-3 сут.

Сухие питательные среды. В лабораторной практике широко используют готовые сухие питательные среды, выпускаемое

промышленностью. Навеску сухой среды, указанную на этикетке, в дистиллированную воду и кипятят до полного растворения порошка. Затем разливают по пробиркам, колбам или бактериологическим: чашкам, и при необходимости стерилизуют в автоклаве или текучепаровом аппарате. Некоторые среды (например: Эндо, Плоскирева, Левина) можно использовать без стерилизации.

Розлив питательных сред. Среда по пробиркам и колбам разливают с помощью приспособления, состоящего из штатива и стеклянной воронки, на конце которой укреплена резиновая трубка со стеклянным наконечником. С этой же целью используют специальные дозирующие устройства - дозаторы.

Контроль питательных сред по биологическим и физико-химическим показателям.

Бактериологическому контролю подлежат все серии питательных сред промышленного производства и все партии сред, приготовленных в лаборатории. В качестве тест-культур используют типовые или местные штаммы бактерий, типичные по всем признакам, в гладкой форме. Тест-культуры хранят в лиофилизированном состоянии или в столбике полужидкого питательного агара, высевают перед использованием на питательный агар и для получения необходимых посевных доз разводят десятикратно стерильным 0,85% раствором натрия хлорида исходную взвесь культуры концентрации 1 млрд бактерий в 1 мл. Определяют следующие биологические показатели питательной среды: чувствительность (ростовую), ингибирующие свойства, дифференцирующие свойства, скорость роста бактерий на среде, воспроизводимость.

Чувствительность питательной среды определяют по минимальному количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий, обеспечивающих появление роста колоний на среде, или по другому варианту - максимальному десятикратному разведению культуры из исходной концентрации 10 ед. мутности (по оптическому стандарту мутности ГИСК

им. Л.А. Тарасевича), обеспечивающему появление роста бактерий на всех засеянных чашках Петри. Ингибирующие свойства среды оценивают как степень подавления прочей микрофлоры по величине посевной дозы в КОЕ, полностью подавляемой на среде, или по отношению количества выросших колоний бактерий к расчетному количеству посеянных бактерий. Дифференцирующие свойства сред изучают путем посева испытуемых видов бактерий в смеси с ассоциантами с последующим определением четкости дифференциации колоний искомым бактериям от ассоциантов. Специфичность дифференцирующего свойства среды выявляют по отсутствию этого свойства у прочих видов бактерий, кроме искомым. Скорость роста бактерий на среде устанавливают по минимальному времени инкубации посевов (в часах), в течение которого обеспечивается четкий, видимый невооруженным глазом, рост культуры (для селективных сред) или формирование колоний с типичными дифференциальными признаками. Воспроизводимость биологических показателей сред оценивают по частоте одинаковых результатов (в %) при повторных использованиях сред с теми же штаммами бактерий. Контроль различных питательных сред по биологическим показателям проводят по конкретным методикам и нормативам руководствуясь официальными документами.

Физико-химический контроль питательных сред в практике лабораторий осуществляют по показателям рН, гН, содержанию аминного азота. Прочие показатели изучают обычно при промышленном производстве питательных сред. Для определения рН и гН сред используют рН - метры, индикаторные бумажки, а также различные химические индикаторы рН и гН вносимые в питательные среды. Содержание аминного азота изучают методом рН-метрического формолового титрования питательных сред по ГОСТу.

Определение рН (реакции) питательной среды. Применяют два метода: колориметрический и электрометрический. Принцип определения рН колориметрическим способом (по Михаэлису) заключается в

сравнении окраски среды после добавления в нее индикатора с окраской готовой шкалы запаянных пробирок с различивши показателями рН (отличаются по цвету). Для определения рН применяют индикаторы нитрофенолового ряда. Так как питательные среды для выращивания микробов в большинстве случаев имеют слабощелочную реакцию, при определении рН пользуются индикаторами ряда метанитрофенола, которым определяют рН от 6,7 до 8,4. Растворы индикатора готовят на дистиллированной воде и хранят в бутылках с притертыми пробками. Сравнение окраски среды и стандарта проводят в компараторе. Меняя стандартные пробирки, подбирают такую, которая по окраске больше всего соответствует испытуемой среде. По обозначению на этикетке стандарта узнают рН.

Электрометрическим методом рН определяют с помощью специальных приборов, к числу которых относится отечественный лабораторный ионометр ЭВ-74. Он состоит из металлического корпуса, где находятся элементы измерительной схемы прибора, а также лабораторного датчика, в комплект которого входят специальные электроды. Их погружают в испытуемый раствор и по шкале прибора определяют рН.

При приготовлении питательных сред приходится производить подщелачивание, так как мясная вода из свежего мяса имеет рН 6,6-6,8. Обнаружив в пробе кислую реакцию, берут новую пробную порцию среды, подщелачивают ее точным количеством децинормального раствора едкого натра или 10%-ного раствора углекислой соды и снова проверяют. После установления нужной реакции высчитывают, какое количество щелочи необходимо для подщелачивания всей среды. Чтобы избежать ошибок, добавлять щелочь следует осторожно; сначала ее берут в несколько меньшем количестве, затем еще раз определяют реакцию среды, после чего добавляют оставшуюся часть раствора щелочи.

При стерилизации сред под давлением рН может снижаться на 0,2-0,4. Поэтому после первого усреднения пробу рекомендуется прокипятить

30 с, а затем после охлаждения снова определить и установить нужный рН. Для определения рН в твердых средах их надо растопить и развести теплой дистиллированной водой.

Посев и культивирование.

Ход работы:

Техника посева бактерий на питательных средах. Для выделения культур бактерий из патологического материала небольшую часть его с помощью бактериологической петли или пастеровской пипетки вносят на какую-либо питательную среду. Это называется посевом. Сначала бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку прожигают над пламенем горелки (тонкий конец пипетки при этом сгибают под прямым углом). Участок органа, из которого будет производиться посев, прижигают нагретым металлическим шпателем или разрезают стерильным скальпелем (при посеве бактериологической петлей).

Берут две пробирки с питательными средами (например: МПБ и МПА), удерживают их в наклонном положении. Обламывают кончик пастеровской пипетки, быстро проводят пипетку через пламя, прокалывают орган в прижженном месте и насасывают в капилляр небольшое количество материала. В целях безопасности при производстве посевов и пересевов нужно пользоваться резиновой трубкой, один конец которой надевают на пипетку, а на другой - резиновую грушу.

После этого открывают сразу обе пробирки (ватные пробки удерживают мизинцем и ладонью правой руки), обжигают края пробирок на пламени, вносят пипетку с материалом в пробирку с бульоном, быстро насасывают небольшое количество бульона в капилляр и переносят в пробирку со скошенным МПА. Края пробирок прожигают над пламенем и закрывают пробками, также проведенными через пламя. Использованную пипетку немедленно помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью, а бактериологическую петлю прожигают над пламенем и ставят в штатив. На

пробирках специальным карандашом отмечают наименование органа, откуда был взят патологический материал, номер экспертизы и дату посева.

Техника пересевов. Берут две пробирки (с культурой бактерий и со свежей средой), удерживая их в наклонном положении. МПА должен быть обращен скосом вверх. Пересев делают бактериологической петлей или пастеровской пипеткой. Петлю прожигают над пламенем, пастеровскую пипетку проводят через пламя, капилляр сгибают под прямым углом и обламывают конец его непосредственно перед пересевом. Над пламенем горелки открывают сразу обе пробирки; проведенной через пламя петлей или пипеткой захватывают небольшое количество материала (петлю надо остудить внутри пробирки) и быстро переносят в пробирку со свежей средой. Посевы на МПА проводят зигзагообразным растиранием материала по поверхности среды. Затем обжигают края пробирок, закрывают их пробками, проведенными через пламя. Петлю прожигают и ставят в штатив; пипетку - в сосуд с дезраствором. Пробирку со средой, на которую был проведен пересев, тотчас подписывают.

Изучение изолированных колоний и отбивка чистых культур

Изучение изолированных колоний составляет второй этап исследования. Строение колоний является важным культуральным признаком при определении вида микроорганизмов, т.к. каждому виду микробов при росте на определенной плотной питательной среде присуща типичная форма колонии.

Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете и с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении.

В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (крупные - от 4-5 мм в диаметре и более; средние - 2-4 мм; мелкие - 1-2 мм и карликовые - меньше 1 мм), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность.

В отраженном свете, рассматривая колонии со стороны крышки, определяют цвет (бесцветная, окрашенная), характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), расположение колоний на поверхности среды (выпуклое, плоское, вдавленное).

При изучении колоний под микроскопом чашку помешают на предметный столик дном вверх. Обращают внимание на характер краев колоний (ровные, фестончатые, зазубренные), структуру (гомогенная, зернистая, однородная или различная в центре и по периферии).

Важно определить тип колонии. Различают два основных типа колоний бактериальной культуры:

а) колонии гладкие - S-тип (от англ. smooth - гладкий), характеризующийся круглой и выпуклой формой, гладкой поверхностью, влажной консистенцией;

б) колонии шероховатые - R-тип (от англ. rough - шероховатый), характеризующийся шероховатой поверхностью, неправильными краями, сухой консистенцией. Образуются из гладких S-форм в результате мутации.

Помимо этих двух основных типов колоний существует так называемый слизистый M-тип (от лат. mucus - слизистый), характеризующийся тягучей слизистой консистенцией; образуется в процессе диссоциации бактериальных культур.

Часть изученной колонии берут для приготовления мазка, который окрашивают и микроскопируют. Если при микроскопии подтверждается однородность состава колонии, то оставшуюся ее часть отвивают на скошенный агар для накопления чистой культуры.

Под понятием "**чистая культура**" подразумевается масса клеток, состоящая из микроорганизмов, принадлежащих одному виду и полученных как потомство одной клетки (см. схему 1).

Штамм - культура бактерий одного вида, выделенная из разных источников в разное время.

Вид - совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам.

Культивировать микроорганизмы можно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Искусственные условия, которые исключили бы загрязнение культуры другими видами, можно создать в пробирке, колбе или чашке Петри.

Вся посуда и питательные среды должны быть простерилизованы и после посева инокулята (микробного материала, используемого для посева) защищены от загрязнения извне, что достигается с помощью пробок или металлических колпачков и крышек.

Посев инокулята

Посев инокулята является первым этапом исследования. В практической работе для получения "чистых культур" микроорганизмов используют одну из модификаций метода высева на чашки со средой. Эти методы основаны на том, что отдельные микроорганизмы иммобилизуются на поверхности или в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-нибудь другое гелеобразующее вещество.

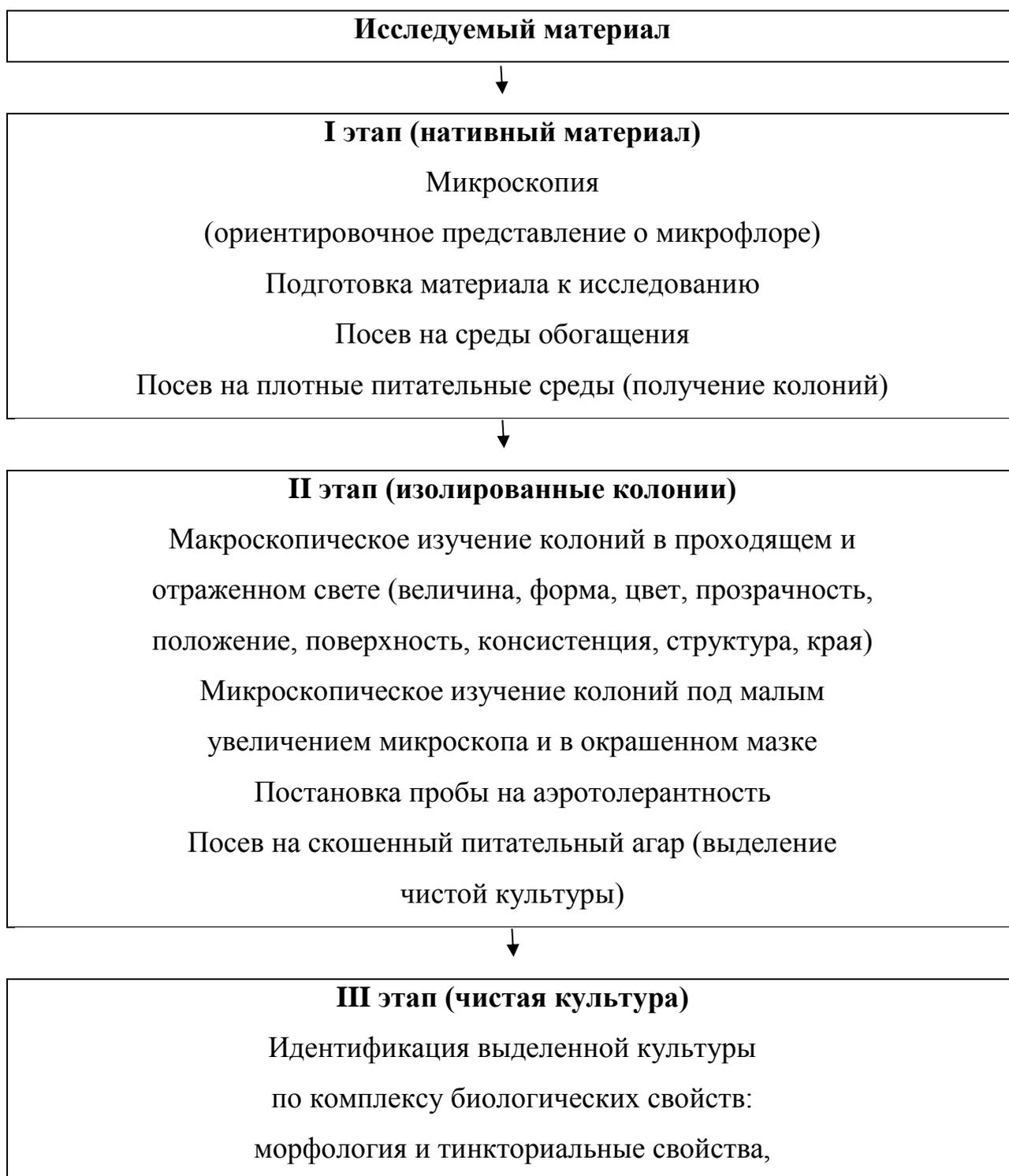
1. Посев петлей: посевной материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, избыток снимают, проколов петлей агар, а оставшийся материал рассеивают параллельными штрихами по стерильной поверхности среды. Это наиболее распространенный способ посева.

2. Посев шпателем: материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, а затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают его по всей поверхности агара. При этом левой рукой придерживают слегка приоткрытую крышку и одновременно вращают чашку. После посева металлический шпатель прокаливают в пламени горелки, а стеклянный помещают в дезинфицирующий раствор.

3. Посев тампоном: тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

Схема 1

Выделение и индентификация чистых культур аэробных и анаэробных бактерий



культуральные свойства,
биохимические свойства,
серологические свойства,
патогенность для животных,
фаголизабельность,
чувствительность к антибиотикам,
другие свойства



Заключение о выделенной культуре

Приготовление чистых культур

Приготовление чистых культур начинают с выделения колоний на/или в агаровой среде, которая была засеяна разведением испытуемой пробы или культурой.

Выделенную колонию затем пересеивают на неселективную агаровую среду. После термостатирования выделяют хорошо изолированную колонию. В случае необходимости повторяют пересев.

Используют метод посева на агар в чашках Петри. В особых случаях могут быть использованы и другие методы. Для анаэробных микроорганизмов могут применяться данные методы, с условием, что культура будет контактировать с воздухом минимально короткое время.

Рассев

Кончиком стерильной петли берут небольшое количество материала с поверхности хорошо изолированной колонии. Затем рассеивают или непосредственно клетки, присутствующие на петле, или суспензию этих клеток после ее приготовления.

Метод прямого посева

П р и м е р

Кончиком петли засевают тесными штрихами примерно третью часть поверхности агаровой среды. Стерилизуют и охлаждают петлю. От края

засеянной поверхности продолжают другую, более разряженную, серию штрихов, засевая половину свободной площади. Повторяют процедуру на оставшейся поверхности, делая еще более редкие штрихи.

Метод с использованием жидкости для разведений

Клетки суспензируют в 1-2 см³ жидкости для разведений, растирая посевной материал петлей о стенки пробирки у поверхности жидкости, затем хорошо перемешивают.

Стерилизуют и охлаждают петли. Захватывают петлей небольшое количество микробной суспензии и далее действуют согласно методу прямого посева.

Термостатирование

Кроме особо оговоренных случаев, переворачивают засеянные чашки Петри, помещают их в термостат и выдерживают при выбранной температуре в течение заданного времени.

Выделение

После термостатирования выделяют с чашки Петри хорошо изолированную колонию для последующего посева или проведения испытания.

Заключительные испытания следует по возможности проводить на клетках, полученных с одной изолированной колонии. Если материал с одной колонии недостаточно, из нее предварительно выращивают субкультуру на жидкой среде или на агаровых чашках Петри. После этого субкультура может быть использована для проведения испытаний.

Среды, наиболее часто используемые для выделения неприхотливых бактерий из клинического материала.

Таблица 1.

Материал	Среды	Условия культивирования
Гнойное отделяемое из тканей абсцессов	КА, среды <i>Эндо (Левина)</i> , <i>Плоскирева</i> (или <i>МакКонки</i>), <i>Цейслера</i> , агар <i>Сабура</i> , тиогликолевый бульон	Образцы гомогенизируют и готовят 10-20% суспензию на фосфатном буфере или пептонной воде
Моча	КА, среда <i>Эндо (Левина)</i> , <i>Плоскирева</i> (или <i>МакКонки</i>)	Засевают 0,001 мл
Мокрота, промывные воды	КА, ША, агар <i>Плоскирева</i> (или <i>МакКонки</i>), агар <i>Сабура</i>	Мокроту гомогенизируют (при наличии комков)
Испражнения	Среда <i>Эндо (Левина)</i> , <i>Плоскирева</i> (или <i>МакКонки</i>), КА	Образцы гомогенизируют и готовят 10% суспензию на фосфатном буфере или пептонной воде
СМЖ и прочие, в норме стерильные, тканевые жидкости	КА, ША, тиогликолевый бульон, сывороточный полужидкий агар	Образец рекомендуется предварительно центрифугировать
Глазное отделяемое	КА, ША, тиогликолевый бульон	

Здесь и в табл. 1 - 2: КА - кровяной агар; ША - шоколадный агар; СА - сахарный агар.

Среды, наиболее часто используемые для выделения прихотливых бактерий из клинического материала.

Таблица 2.

Микроорганизм	Среды	Условие культивирования
<i>Corynebaclerium diphtheriae</i>	Среды <i>Клауберга II</i> и <i>Маклеода</i>	35-37°C, 24-48 ч
Виды <i>Nocardia</i>	Агар <i>Сабуро</i> без левомецетина, КА	35-37°C, 5-7% CO ₂ , до 3 нед
<i>Francisella tularensis</i>	Глюкозо-цистеиновый агар, среды <i>МакКоя</i> и <i>Емельяновой</i>	35-37°C, до 2 нед
Виды <i>Brucella</i>	КА (с овечьей кровью), ША, среда для бруцелл	35-37°C, 5-10% CO ₂ , до 3 нед
<i>Bordelella pertussis</i>	Агар <i>Борде-Жангу</i> , казеиново-угольный агар	35-37°C, в атмосфере повышенной влажности, до 1 нед
Виды <i>Legionella</i>	Угольно-дрожжевой агар с буфером, дополненный α-кетоглутаратом	35-37°C, в атмосфере повышенной влажности, до 2 нед
<i>Haemophilus ducreyi</i>	ША, дополненный 5% сыворотки барана (также МПА, обогащённый 1/3 дефибринированной крови барана) и ванкомицином (3 мкг/мл)	35-37°C, 5-7% CO ₂ , до 1 нед

Виды <i>Vibrio</i>	Тиосульфат-цитрат-жёлчно-сахарозный агар и щелочная пептонная вода	35-37°C, 24-48 ч
<i>Leptospira interrogans</i>	Среда Ферворта-Вольфа, среда Флетчера	25-30°C, в темноте, до 6 нед
Виды <i>Mycobacterium</i>	Среда Лёвеништайна-Иенсена, среда Дорсе	35-37°C (30°C для видов, вызывающих кожные поражения), 5-7% CO ₂ , в темноте, до 6-8 нед

Биохимические методы индикации бактерий.

Методов, используемых для идентификации особенностей метаболизма бактерий, очень много, но на практике применяют значительно меньшее их количество. Многие из способов выявления тех или иных субстратов обуславливают применение дифференциально-диагностических сред, включающих различные индикаторы. Наиболее распространенные биохимические тесты представлены в табл. 3

Основные биохимические тесты, применяемые для индикации бактерий.

Таблица 3.

Тест	Принцип действия	Вариант применения
На лабильность к солям жёлчи	Соли жёлчных кислот растворяют <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Для дифференцировки от прочих α-гемолитических стрептококков

На каталазную активность	Фермент разлагает H_2O_2 и вызывает образование кислорода (пузыри в среде)	Для дифференцировки стрептококков (отрицательны) от стафилококков (положительны)
На коагулазную активность	Фермент вызывает коагуляцию плазмы	Для дифференцировки коагулазаположительных (<i>S. aureus</i>) и коагулазаотрицательных стафилококков
На ДНКазную активность	ДНКаза гидролизует ДНК, негидролизованная ДНК осаждается HCl	Для дифференцировки ДНКазоположительных (<i>S. aureus</i>) и ДНКазотрицательных стафилококков
Бактериостатический метод Хедольсона	Рост различных бруцелл ингибирует внесение в среду основного фуксина или тионина	Для дифференцировки видов <i>Brucella</i>
Посев на среды Гисса	Выявляет способность к росту и ферментации различных углеводов с образованием кислоты	Для дифференцировки видов <i>Corynebacterium</i>
Тест на образование индола	Разложение триптофана в среде приводит к образованию индола, выявляемого по	Для дифференцировки эшерихий от прочих энтеробактерий

	красному окрашиванию после внесения в среду реактива <i>Ковача</i>	
Цитратная проба <i>Козера</i>	Рост на среде с цитратом (<i>Симмонса</i> или <i>Козера</i>) вызывает сдвиг pH в щелочную сторону и посинение ранее зелёной среды	Для выявления бактерий, способных утилизировать цитрат в качестве источника углерода
Тест на лецитиназную активность на яичной среде с лактозой	Выявляет зону преципитации (лецитиназную активность), ферментацию лактозы, липазную и протеиназную активность	Для дифференцировки видов <i>Clostridium</i>
Проба с лакмусовым молоком	Ферментация приводит к восстановлению и обесцвечиванию лакмусового молока	Для индикации энтерококков (положительны) и некоторых клостридий
Реакция с метиловым красным для определения интенсивности кислотообразования из глюкозы (метилротреакция)	После добавления индикатора при сильном кислотообразовании (pH 3,0) наблюдаются окрашивание среды в красный цвет; при умеренном	Для индикации <i>Escherichia coli</i> и <i>Enterobacter</i>

	кислотообразовании (рН 6,0) среда окрашивается в жёлтый цвет	
Ферментация углеводов нейссериями	Выявляет ферментацию глюкозы, мальтозы и лактозы	Для дифференцировки <i>N.gonorrhoeae</i> (ферментирует глюкозу) и <i>N. meningitidis</i> (глюкозу и мальтозу) от других нейссерий
Восстановление нитратов	Фермент нитрат редуктаза восстанавливает NO ₃ в NO ₂	Для дифференцировки энтеробактерии (восстанавливают нитраты) от прочих грамотрицательных палочек
Тест на оксидазную активность	Оксидаза окисляет фенилендиамин, что приводит к появлению синего окрашивания	Для выявления оксидазоположительных бактерий, например вибрионов или нейссерий
Тест Хью-Лейфсона (на окисление и ферментацию глюкозы)	Микроорганизмы инкубируют в 2 пробирках со средой, содержащей глюкозу: первую - в аэробных (для выявления окисления), вторую - в анаэробных (для выявления	Для дифференцировки бактерий, окисляющих глюкозу (например, псевдомонад), от ферментирующих её (например, энтеробактерии)

	ферментации) условиях	
Посев на пептонную воду с набором углеводов («пёстрый» ряд)	Выявляет способность к ферментации глюкозы, маннита, лактозы, сахарозы, дульцита и мочевины с образованием кислоты или кислоты и газа	Для дифференцировки энтеробактерии
Тест на фенилаланин дезаминазную активность	Разложение фенилаланина приводит к образованию фенилпировиноградной кислоты, окрашивающей среду в зелёный цвет после добавления хлорида железа	Для дифференцировки протеев (положительны) от прочих энтеробактерии
Уреазный тест	Уреазоположительные бактерии разлагают мочевину с образованием аммония, что приводит к красному окрашиванию среды, содержащей феноловый красный	Для дифференцировки протеев (положительны) от прочих энтеробактерии

Реакция <i>Проскауэра</i>	<i>Фогеса-</i>	Некоторые энтеробактерии при ферментации глюкозы образуют ацетилметилкарбинол (ацетоин), окрашивающий среду в красный цвет при взаимодействии с креатинином	Для дифференцировки положительных энтеробактерии (например, <i>Klebsiella pneumoniae</i>) от отрицательных (например, <i>E. coli</i>)
X- и V-тест		Некоторые бактерии способны расти только при наличии X-фактора роста (порфирина) и/или V-фактора (никотинамиддинуклеотид)	Для дифференцировки видов <i>Haemophilus</i>

Изучение биохимических свойств выделенных микроорганизмов

Биохимические свойства выделенных микроорганизмов изучают на третьем этапе. Культуру микроорганизмов, выросшую на скошенном агаре, проверяют на чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. При микроскопии обращают внимание на форму микроба, величину, расположение клетки. Специальными окрасками выявляют споры, капсулы, включения и жгутики.

Для идентификации культур, т.е. установления вида и типа бактерий, помимо морфологических и культуральных признаков изучают биохимические, антигенные и другие свойства.

Определение протеолитических свойств микробов. Действие протеолитических ферментов, т.е. способность микроорганизмов расщеплять

белки, изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При посеве уколом в столбик желатиновой среды микробы, разлагающие желатин, разжижают среду. Действие микроорганизмов, разлагающих казеин (молочный белок), проявляется в пептонизации (просветлении) молока, которое приобретает вид молочной сыворотки.

В процессе ферментации пептонов микроорганизмами образуются индол (C_8H_7N), сероводород (H_2S), аммиак (NH_3) и другие соединения.

Для обнаружения сероводорода в пробирку с МПБ, после посева исследуемой культуры, помещают под пробку узкую полоску фильтровальной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца: уксуснокислого свинца - $Pb(CH_3COO)_2$, - 30 г; двууглекислого натрия - $NaHCO_3$, - 1г; дистиллированной воды - 100 мл. При наличии сероводорода индикаторная бумага чернеет вследствие образования сернистого свинца (PbS).

Для выявления индола используют индикаторную бумажку, пропитанную горячим насыщенным раствором щавелевой кислоты ($C_2H_2O_4$). В присутствии индола бумага становится красной. Определение индола можно провести и с помощью реактива Эрлиха, который состоит из парадиметиламидобензальдегида (5 г), очищенной концентрированной фосфорной кислоты (H_3PO_4) (10 мл) и 96% этилового спирта (50 мл). К 48-часовой бульонной культуре прибавляют 1-2 мл серного эфира, основательно встряхивают и затем прибавляют по стенке пробирки 4-5 капель реактива Эрлиха. Через 1 -2 мин появляется ярко-малиновое кольцо в нижней части эфирного слоя, которое свидетельствует о наличии индола.

Аммиак определяют при помощи увлажненной красной лакмусовой бумажки. В присутствии аммиака бумажка синееет.

Определение сахаролитических свойств микробов. Способность микроорганизмов разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты, а иногда и газа изучают на средах Гисса. В состав этих сред входят пептонная вода, углевод (моносахариды - глюкоза,

ксилоза, арабиноза; полисахариды - крахмал, гликоген), многоатомные спирты (глицерин, маппит, сорбит, инозит) и индикатор. Под действием образующейся при разложении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Газообразование определяется по наличию пузырьков газа в толщине полужидких сред или, если среда жидкая, в поплавке (стеклянная трубочка, верхний конец которой запаян).

Сахаролитические свойства изучают и на таких средах, как Эндо, Левина, Плоскирева. В состав этих сред входит молочный сахар - лактоза, и если микроорганизмы разлагают его до кислоты, то цвет колонии изменяется соответственно индикатору, находящемуся в среде.

Определение ферментов микробов. Биохимическая активность микроорганизмов обусловлена их ферментативной деятельностью. Ферменты микроорганизмов являются биологическими катализаторами, определяющими метаболические процессы, протекающие в микробных клетках. Разные виды микроорганизмов нередко отличаются по набору ферментов, которые они способны синтезировать.

Плазмокоагулаза - выявляется в пробирочном опыте по определению скорости свертывания испытуемым микробом цитратной кроличьей или человеческой плазмы.

Гемотоксин - вызывает лизис эритроцитов. Определяется при посеве испытуемых микробов на кровяной агар. Вокруг колонии наблюдается зона просветления среды.

Лецитиназа - разрушает лецитовителлин яичного желтка. Обнаруживается при посеве испытуемых микробов на желточно-солевой агар (ЖСА) по образованию вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком.

Гиалуронидаза - расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани. В пробирку с испытуемой культурой внести гиалуроновую кислоту и после 30-минутной экспозиции при 37°C добавить

2 капли крепкой уксусной кислоты. При наличии фермента гиалуроновая кислота утрачивает способность образовывать сгусток.

Фибринолизин - растворяет фибрин плазмы крови, добавленной к питательной среде.

Лабораторная работа № 5.

Индикация бактериальных антигенов

Для экспресс-диагностики инфекционных болезней применяют разнообразные методы, выявляющие бактериальные Аг - компоненты клеточной стенки, жгутиков, капсул, ДНК, а также некоторые секреторные продукты (например, токсины). Из многих тестов наиболее распространены и эффективны метод встречного электрофореза, реакция латекс-агглютинации и иммуноферментный метод.

Встречный иммуноэлектрофорез (электросинерез, впервые применён *Бендари* в 1969 г, для обнаружения преципитатов Аг-АТ) - разновидность реакции иммунопреципитации в агаровом, агарозном геле или на ацетатцеллюлозных мембранах; однако контакт обусловлен не свободной диффузией агентов, а эффектом постоянного электрического поля, что усиливает способность к взаимодействию низкоректогенных Аг и АТ. Накопление и преципитация комплекса между стартовыми лунками происходит в течение 30-180 мин. **Основное условие для применения метода** - наличие электрофоретической подвижности Аг, отличной от таковой у АТ. **Основные достоинства метода** - высокая чувствительность, в 10 раз превышающая чувствительность метода двойной иммунодиффузии по *Оухтерлони*; возможность индикации Аг, не выявляемых методом диффузии, и скорость - результаты можно учитывать через 1-3 ч (для полноценной иммунодиффузии - через 24 ч). **Недостатки метода** - высокая стоимость, трудность интерпретации и невозможность получить адекватные результаты при работе с некоторыми образцами. **Чувствительность** метода при работе с СМЖ не превышает 0,05 мг Аг/мл (около 1000 бактерий),

поэтому в большинстве лабораторий отдают предпочтение методу агглютинации частиц латекса.

Латекс-агглютинация. Принцип метода основан на взаимодействии Аг, присутствующего в образце, с частицами латекса, нагруженными специфическими моноклональными АТ, что ведёт к образованию видимых агрегатов. Учёт результатов проводят через 10-15 мин при косом освещении на тёмном фоне. Разработаны коммерческие диагностикумы для индикации Аг *Streptococcus pneumoniae*, стрептококков группы В, *Haemophilus influenzae* типа b и капсулированных штаммов менингококка (следует помнить, что Аг менингококков типа b дают перекрёстные реакции с Аг *Escherichia coli* в различных тканевых жидкостях: СМЖ, сыворотке, моче). Также имеются наборы для выявления Аг стрептококков группы А в мазках из зева; для первичной экспресс-идентификации колоний стрептококков групп А, В, С, F, энтерококков, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типов a-f, золотистого стафилококка, *Neisseria meningitidis* и *Neisseria gonorrhoeae*. Недостатками метода являются достаточно высокая стоимость диагностикумов и возможность получения артефактов, особенно в присутствии ревматоидных факторов и продуктов фибринолиза.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Метод независимо разработали в начале 70-х гг. шведские исследователи *Энгвалл* и *Перлманн*, голландские *ван Вемен* и *Шуур* и американские исследователи под руководством *Рубинстайна*. Принцип метода весьма напоминает разработанный *Ялоу* и *Берсоном* (1960) метод радиоиммунологического анализа (РИА), но в его основу положено маркирование ферментом Аг или АТ, вступающих в реакцию. Взаимодействие метки с субстратом обычно сопровождается изменением окраски среды. К настоящему времени созданы многочисленные модификации базовой методики и наибольшее распространение получил гетерогенный иммуноферментный анализ на твёрдой фазе (**твёрдофазный ИФА**). Коммерческие моноклональные АТ фиксируют на лунках пластиковых панелей, реже АТ иммобилизуют на пластиковых или

металлических бусах либо на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах (рис.15).



Рисунок 15. Схема выявления Аг методом прямого и конкурентного твердофазного ИФА. (Из; Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B. *Mechanisms of microbial diseases*, 2nded., Williams & Wilkins, 1993.)

По сравнению с классическими методами выявления Аг этот метод позволяет непосредственно регистрировать их взаимодействие с АТ, а не анализировать вторичные его проявления - агглютинацию, преципитацию или гемолиз. Метод отличается высокой чувствительностью - обычно достаточно присутствия Аг в концентрации 1 нг/мл. На практике метод широко

применяют для выявления Аг *Chlamydia trachomatis* в мазках из уретры и влагалища, стрептококков группы А в мазках из зева и токсина *Clostridium difficile* в фекалиях. Чувствительность метода составляет 70% для Аг стрептококков группы А и более 90% для токсина *Clostridium difficile*.

Классические методы выявления бактериальных Аг - реакции агглютинации, преципитации и гемолиз сенсibilизированных эритроцитов для экспресс-диагностики инфекций - применяют достаточно редко, т.к. они требуют наличия значительной концентрации Аг в образцах, что нетипично для ранних этапов заболевания. Однако их **широко используют для серотипирования** возбудителей, а также при проведении полного объёма бактериологических исследований. Наибольшее распространение нашла реакция агглютинации (точнее, иммуноагглютинации) с коммерческими антисыворотками (рис. 16). Некоторые примеры серотипирования бактерий в реакции агглютинации представлены в таблице 4. Пожалуй, единственной реакцией преципитации для экспресс-диагностики бактериальных Аг остаётся реакция *Асколи*.

Основные виды типирования патогенных бактерий на основании структуры
поверхностных Аг.

Таблица 4.

Возбудитель	Типирующая система	Выявляемые Аг
β-гемолитические стрептококки	Группы по <i>Лэнсфилд</i>	Углеводные Аг клеточной стенки
β-гемолитические стрептококки группы А	Группы по <i>Гриффиту</i>	Аг белка М клеточной стенки
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Серотипы	Полисахариды капсулы (более 80 серотипов)
<i>Neisseria meningitidis</i>	Серогруппы	Полисахариды капсулы (13 серогрупп)

<i>N. meningitidis</i>	Подтипы	Белки клеточной стенки
<i>Haemophilus influenzae</i>	Типы по <i>Питтману</i>	Полисахариды капсулы 6 типов (a-f)
Виды <i>Salmonella</i>	Схема <i>Кауфмана-Уайта</i>	Классифицируют по составу О- и Н-Аг
Виды <i>Shigella</i>	Серогруппы и серотипы	По О-Аг выделяют группы А, В, С и D, а также серотипы в группах А, В и С
<i>Vibrio cholerae</i>	Серогруппы	Классифицируют по составу О-Аг
<i>Vibrio cholerae</i> 01	Подтипы	Структура 01-Аг выделяет подтипы А, В и С (подтипы Огава, Инаба и Хикоджима)

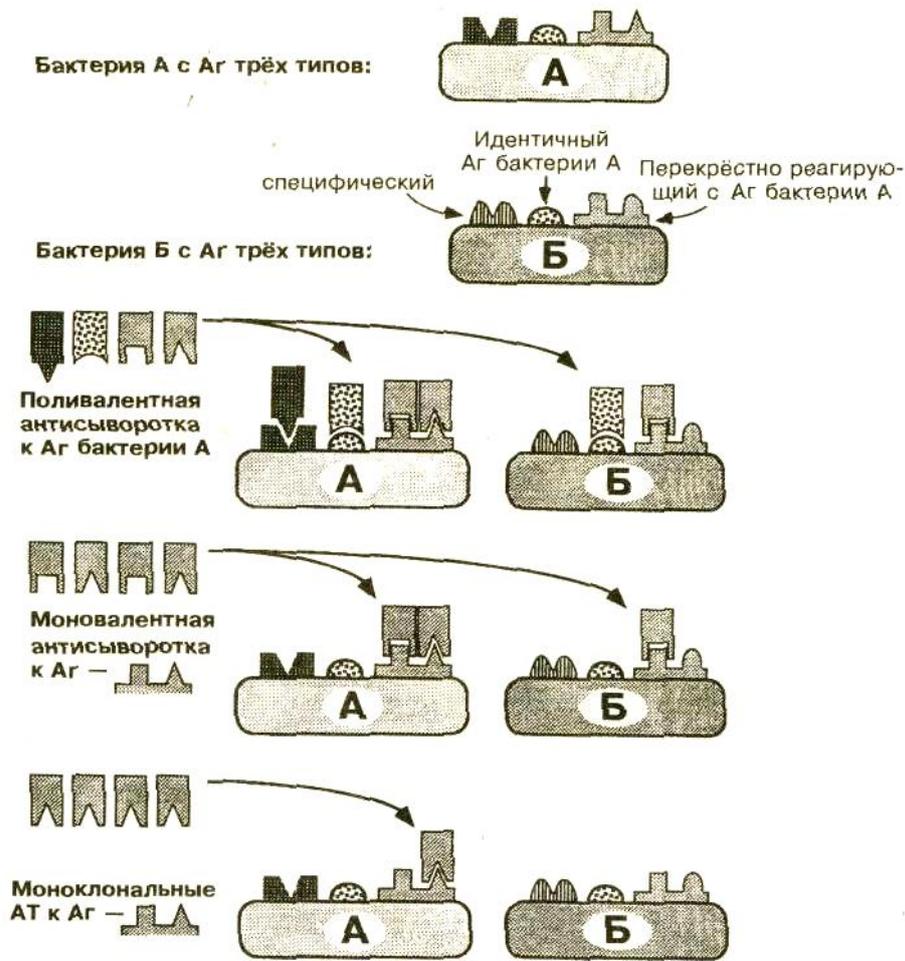


Рисунок 16. Принципиальные схемы реакций антисывороток с исследуемыми Аг. (Из Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B. *Mechanisms of microbial diseases*, 2nd ed., Williams & Wilkins, 1993.)

Методы индикации нуклеиновых кислот. В большей степени методы выявления РНК и ДНК возбудителя нашли применение в диагностике вирусных инфекций. Тем не менее разработаны тест-системы для идентификации некоторых прихотливых бактерий (например, легионелл, хламидий), а также для индикации колоний *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* типа b, стрептококков группы В, энтерококков и микобактерий.

1. Наиболее распространены **методы гибридизации ДНК и РНК.** Принцип метода обусловлен способностью ДНК (и РНК) специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными фрагментами

искусственно созданных нитей ДНК (и РНК), меченных изотопами или ферментами (пероксидазой или щелочной фосфатазой). В дальнейшем образцы исследуют методом ИФА (рис. 17).

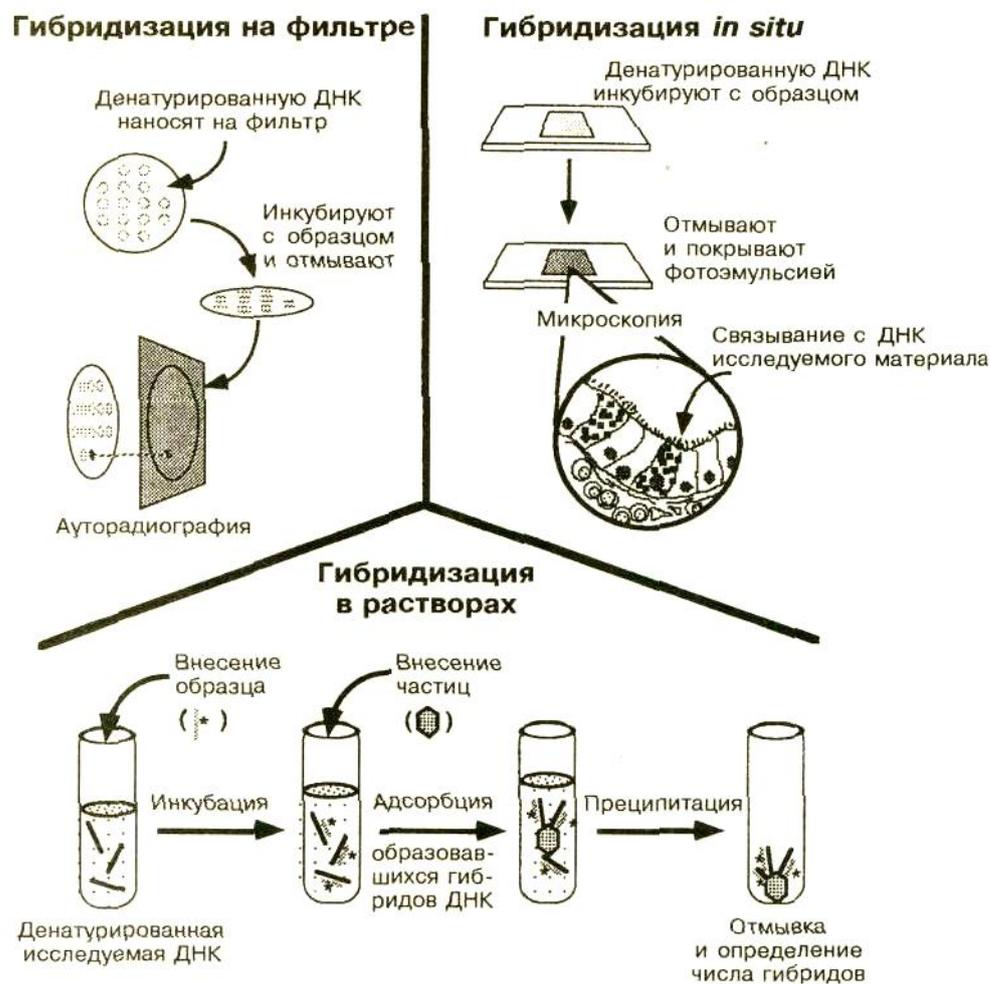


Рисунок 17. Принципиальные схемы реакций гибридизации нуклеиновых кислот. (Из Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B. *Mechanisms of microbial diseases*, 2nd ed., Williams & Wilkins, 1993.)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). С развитием молекулярной биологии стало возможным гибридизировать фрагменты ДНК (и РНК) и были разработаны различные методы, например лигазная цепная реакция, Q-β- система и др. Наибольшее практическое применение нашла ПЦР (метод предложил Мюллис, 1983). Основа метода - катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий (амплификация)

определённого участка ДНК. Этапы метода: термическое разделение двухнитевой молекулы ДНК на отдельные цепочки (30-40 с при 93-95 °С), охлаждение среды и внесение праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям обеих цепочек. Для запуска реакции используют синтетические праймеры - олигонуклеотиды, состоящие из 10-20 нуклеотидов (например, дезоксинуклеотидтрифосфат), взаимодействующие с окончаниями последовательностей и образующие последовательности в 50-1000 оснований. Затем в среду вносят термостабильную *tag* (по названию бактерии *Thermus aquaticus*)-полимеразу, что запускает образование вторичных копий цепей ДНК, после чего образующиеся двухнитевые молекулы ДНК снова подогревают. Образующиеся отдельные цепочки остужают, вносят праймеры и снова повторяют процедуру подогрева и охлаждения; термостабильность полимеразы обуславливает стабильность фермента т отсутствие необходимости в его повторном внесении (рис. 18).

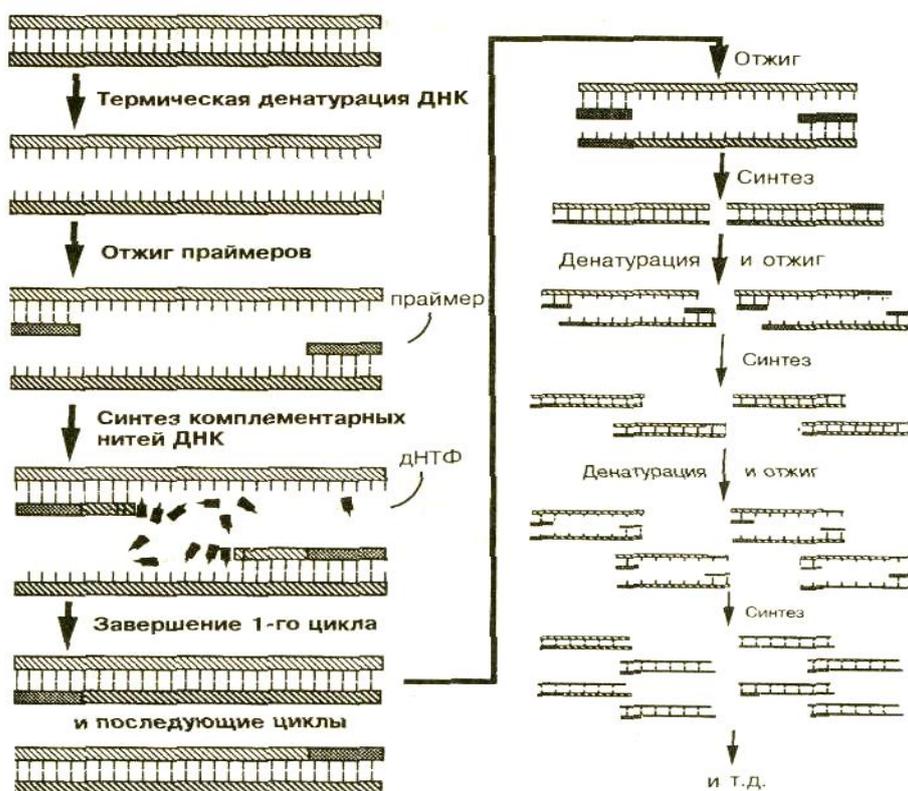


Рисунок 18. Принципиальная схема полимеразной цепной реакции. дНТФ - дезоксинуклеотидтрифосфат (Из: Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B. *Mechanisms of microbial diseases*, 2nd ed., Williams & Witkins, 1993.)

После 30-80 циклов накопления копий ДНК проводят их идентификацию методом электрофореза. Для подтверждения принадлежности ДНК возбудителю молекулы можно подвергнуть рестрикции специфическими эндонуклеазами или провести реакцию ДНК-гибридизации. ПЦР - чрезвычайно чувствительный метод, теоретически для получения результата достаточно иметь в среде одну молекулу ДНК.

а. Для диагностики инфекционных заболеваний маркером возбудителя является его геном. Для амплификации (т.е. синтеза ДНК-матрицы) отбирают его наиболее консервативную часть (обычно какой-нибудь уникальный ген), наиболее четко отличающую его от прочих патогенов.

б. Для запуска синтеза на ДНК-матрице используют 2 праймера, комплементарные нити ДНК на обоих концах специфического фрагмента. Взаимодействие спраймерами называют отжигом (реакция проходит за 20-60 с при 50-65 °С).

в. В результате достраивания цепей ДНК в специфическом фрагменте под действием термостабильной полимеразы (оптимум реакционной способности 70-72°С) формируется специфический фрагмент (ампликон). После окончания первого цикла проводят повторные циклы; синтезированные в них ампликоны также будут служить матрицами для последующих циклов. Рассчитано, что за 30-40 циклов из одной матрицы можно получить 10^8 ампликонов.

Лабораторная работа № 6.

Индикация антибактериальных антител

Одновременно с выделением и изучением основных возбудителей инфекций человека интенсивно развивались **серологические методы** их диагностики; принципы основных серологических реакций были заложены исследованиями антимикробных факторов сыворотки крови - бактериолизин (Пфайффер, В.И. Исаев, 1894), агглютининов (Груббер, Дюрэм, 1896), преципитинов (Краус, Ф.Я. Чистович, 1897-1989) и комплемента (Бюхнер, Борде, 1889, 1898). И в настоящее время

серологические методы остаются важным инструментом в диагностике и лечении инфекционных болезней, поскольку они *обнаруживают специфические АТ; большая их часть приемлема для идентификации Аг возбудителя; они остаются, пожалуй, единственным методом диагностики при невозможности или трудностях выделения возбудителя, сравнительно редко дают ложноположительные или ложноотрицательные результаты.* Выявление АТ к специфическому агенту даёт возможность получить результат не только в случае выраженной текущей инфекции, но и при первичном инфицировании. Следует отметить, что классические реакции выявления АТ, равно как и Аг, в значительной степени потеряли своё значение в экспресс-диагностике бактериальных инфекций. С одной стороны, все они чувствительны к более или менее значимым титрам АТ, появляющимся к концу первой-началу второй недели болезни. С другой стороны, их реализация требует адекватного количества Аг - его убыток блокирует все молекулы АТ и образование новых комплексов (аналогичную картину наблюдают при недостатке Аг), что приводит к появлению «зон задержки» (отсутствие агглютинации или преципитации) при малых разведениях сыворотки или в разведениях 1:160-1:320 и выше (феномен прозоны). Тем не менее они остаются методами диагностики инфекций, возбудителей которых трудно выделять в условиях стандартной лаборатории (например, бруцелл, франциселл, риккетсий, лептоспир, боррелий, бледных спирохет и др.). Серологические реакции также активно применяют при проведении полного объёма диагностических исследований, при неудачах с выделением возбудителя увеличение титров АТ является дифференциально-диагностическим признаком. Все серологические реакции разделяют на простые и сложные.

Простые реакции. Обычно реагируют 2 компонента - Аг и АТ. К простым реакциям относят реакции агглютинации (РА), разделяемые на РА с неадсорбированным Аг и РА с Аг, адсорбированным на корпускулярных носителях (эритроцитах, бактериях, нерастворимых красителях, бентонитах и

т.д.). К простым реакциям также относят реакции преципитации (в жидкостях и гелях), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и опсонофагоцитарные реакции. Простыми реакциями считают и косвенные (трёхкомпонентные) реакции, в состав которых входят реагирующие системы (животные, эритроциты и т.д.), например реакции нейтрализации (РН) возбудителя, реакции нейтрализации Аг (токсины, метаболиты) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

1. Реакции агглютинации. Механизм РА описывает теория решётки, согласно которой двухвалентное АТ взаимодействует одним активным центром с детерминантой одного Аг, а другим - с детерминантой второго Аг. В результате подобного взаимодействия образуется агглютинат. Его образование невозможно при дефиците или избытке АТ. Визуально реакция проявляется склеиванием корпускулярных Аг АТ (агглютининами) и реализуется в изотоническом растворе NaCl (рис. 5).

а. Термостабильные соматические О-Аг выдерживают кипячение в течение 2 ч; через 18-24 ч при 37°C образуют мелкозернистые агрегаты.

б. Термолабильные жгутиковые Н-Аг разрушаются при 100°C и под действием этанола; в реакциях с Н-антисывороткой через 2 ч инкубации дают рыхлые крупные хлопья (образованы бактериями, склеившимися жгутиками).

в. Vi-Аг (Аг Феликса-Питта) брюшнотифозных бактерий относительно термостабилен (выдерживает температуру 60-62°C); при инкубации с Vi-антисывороткой образует мелкозернистый агглютинат.

г. Титр сыворотки. Реакция агглютинации недостаточно специфична; её чувствительность и специфичность можно повысить разведением исследуемой сыворотки до её титра или до половины титра. *Титром сыворотки называют максимальное разведение, дающее агглютинацию Аг.*

д. Реакция адсорбции агглютининов. Если различные бактерии по систематическому положению имеют одинаковые или похожие по структуре Аг, то их агглютинируют одни и те же сыворотки. Для облегчения их

идентификации используется реакция адсорбции агглютининов, основанная на способности Ag родственных бактерий адсорбировать из сыворотки только групповые АТ, сохраняя в ней типоспецифические АТ. Полученные антисыворотки называют монорецепторными, т.к. они содержат АТ только к одному Ag. Для сорбции агглютининов применяют взвесь убитых бактерий; если они убиты нагреванием, то адсорбируются О-агглютинины, если формалином, то Н-агглютинины.

е. Непрямые реакции. Методы, использующие иммунологически инертные частицы (адсорбенты), обработанные Ag, называют непрямыми, или пассивными, реакциями. Исходным является разведение сыворотки 1:20. В качестве Ag используют живые и убитые бактерии из S-колоний в физиологическом растворе.

(1) Реакция не прямой, или пассивной, гемагглютинации (РИГА, РПГА) основана на способности АТ взаимодействовать с Ag, фиксированными на различных эритроцитах, которые при этом агглютинируют. Разновидность метода - **реакция латекс-агглютинации** (см. выше). В некоторых случаях на частицах фиксируется не Ag, а АТ (**обратная РПГА**).

(2) Реакция торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА) является дальнейшим развитием РИГА и в некотором смысле контролирует её специфичность. В отличие от РИГА, включает 3 компонента: Ag, АТ и АТ (Ag), адсорбированные на эритроцитах.

ж. Реакция Кумбса. Метод выявляет **неполные (одновалентные) АТ**, образующиеся при бруцеллёзе, резус-конфликте или системных коллагенозах. Для постановки реакции необходима антиглобулиновая сыворотка, содержащая полные (как минимум двухвалентные) АТ. Неполные АТ предварительно инкубируют с корпускулярным Ag и вносят антиглобулиновую сыворотку. Одна молекула полных АТ взаимодействует с двумя молекулами неполных АТ, связавших Ag, в результате происходит видимая агглютинация или гемагглютинация. Поскольку целью реакции

является выявление неполных АТ, её также обозначают как **антиглобулиновый** тест.

з. Следует отличать реакцию иммуноагглютинации от химической (кислотной) агглютинации, наступающей после внесения бактериальной взвеси в растворы некоторых кислот и солей (например, уксусной или молочной) и спонтанной агглютинации при изменении коллоидно-химических свойств соматических Аг.

2. Реакции преципитации (РП) основаны на феномене образования видимого осадка (преципитата) после взаимодействия растворимых либо находящихся в коллоидном дисперсном состоянии Аг с АТ. РП позволяют выявлять незначительные количества Аг (до 10^6 белка). Они очень чувствительны, и их применяют для тонкого иммунохимического анализа, выявляющего отдельные компоненты в смеси Аг. Метод имеет много разновидностей.

а. Реакция кольцепреципитации. На слой антисыворотки наслаивают жидкость, содержащую Аг, и через несколько секунд наблюдают образование кольца преципитата.

б. Реакция микропреципитации (по *Уанье*) применяется для нефелометрического выявления АТ в небольших образцах сыворотки.

в. Широкое распространение получили модифицированные методы - **реакции преципитации в геле**; методически они отличаются тем, что преципитирующая сыворотка уплотняется добавлением геля (агар, агароза, карбоксиметилцеллюлоза и др.). Известны **простая одномерная иммунодиффузия**, **двойная (встречная) одномерная иммунодиффузия**, **радиальная иммунодиффузия** (по *Манчини*) и **двойная (встречная) радиальная иммунодиффузия** (по *Оухтерлоню*). Методы простой диффузии основаны на способности Аг, внесённого в лунки, диффундировать в гель. При постановке реакций двойной диффузии АТ и Аг вносят в отдельные лунки. Обычно методы используют для выявления белковых Аг в различных жидкостях и тканевых экстрактах.

3. Реакции нейтрализации (РН) основаны на способности АТ связывать различные возбудители или их метаболиты, лишая их возможности реализовать свои биологические свойства (т.е. нейтрализовать их). Известны РН вирусов, токсинов и др. В определённой степени к ним относятся и реакции иммобилизации (рис. 19).

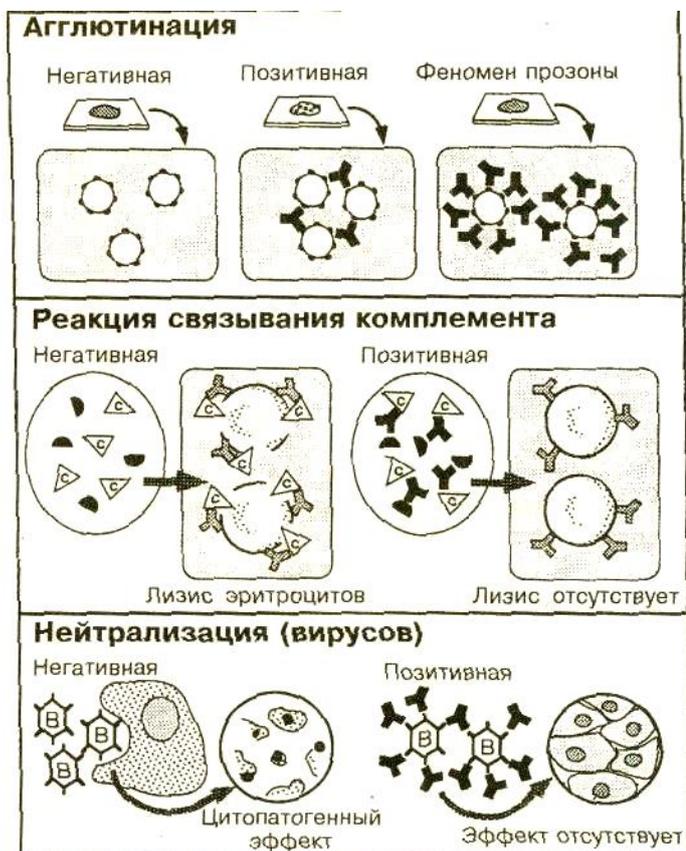


Рисунок 19. Принципиальные схемы реакций агглютинации, связывания комплемента и нейтрализации.

а. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на способности антисывороток ингибировать вирусиндуцированную гемагглютинацию. АТ связывают различные вирусы, лишая их возможности агглютинировать эритроциты. РТГА применяют в диагностике вирусных инфекций для выявления специфических антигемагглютининов и идентификации различных вирусов по их гемагглютинином, проявляющим свойства Аг.

б. Реакция нейтрализации вирусов. В сыворотке переболевших лиц циркулируют АТ, нейтрализующие инфекционность вирусов. Их наличие выявляют смешиванием культуры возбудителя с сывороткой с последующим введением лабораторному животному или заражением культуры клеток. На эффективность нейтрализации указывает выживание животного либо отсутствие цитопатического эффекта в клеточных культурах.

в. Реакция нейтрализации токсинов. Принцип реакций во многом аналогичен реакциям нейтрализации вирусов. Иммунная сыворотка (**антитоксин**) связывает токсин и блокирует его действие. Для определения антитоксического иммунитета у человека часто применяют **кожные пробы** (например, пробу *Шика*). Для идентификации токсина и определения титра антитоксических АТ их смесь вводят подопытным животным. При соответствии типа токсина и антисыворотки гибели животных не наблюдают.

г. Реакции иммобилизации основаны на способности специфических АТ, циркулирующих в сыворотке больных, подавлять подвижность различных микроорганизмов. На практике применение нашли реакции иммобилизации бледной трепонемы и холерного вибриона.

4. Реакции иммунного лизиса. Специфические АТ взаимодействуют с различными клетками, в том числе бактериями и простейшими, что приводит к активации системы комплемента по классическому пути и последующему лизису клеток. Среди них известны реакции вибриолиза и реакции гемолиза.

Сложные реакции включают в себя несколько простых; к ним относят реакции связывания комплемента (РСК), реакции подавления связывания комплемента и реакции активации Аг из нейтральной смеси .

1. Реакция связывания комплемента. Наибольшее распространение нашла РСК, её применяют при диагностике различных бактериальных и вирусных инфекций. Основными факторами, лимитирующими более широкое применение РСК, являются её сложность (включает 5 компонентов), лабильность некоторых компонентов [их необходимо готовить прямо перед постановкой реакции (комплемент) либо за несколько суток

(эритроциты барана)] и возможные антикомплементарные свойства у сывороток и Аг. Во избежание артефактов приходится предварительно титровать рабочие дозы ингредиентов.

2. Реакция иммунного гемолиза. Нередко активация системы комплемента комплексом Аг-АТ визуально не проявляется, и для её выявления в качестве индикаторной системы используют реакцию иммунного гемолиза. Для этого в реакционную смесь вносят гемолитическую систему - эритроциты барана, сенсibilизированные гемолитической кроличьей аитисывороткой. При наличии свободного комплемента (т.е. при отсутствии связывающего комплекса Аг-АТ) наблюдают гемолиз эритроцитов и реакцию считают отрицательной. Если все молекулы комплемента связываются с иммунными комплексами, то разрушения эритроцитов не наблюдают и реакцию считают положительной.

Большее диагностическое значение имеют **методы выявления АТ различных классов**, т.к. по их принадлежности и титру можно определить фазу инфекционного процесса. Для этого обычно используют **коммерческие тест-системы** (например, для выявления IgM к Аг *Mycoplasma pneumoniae*). Вполне доступна **унитиоловая проба**; в основу метода положена способность унитиола расщеплять дисульфидные (S-S) мостики в молекулах IgM, не IgG. Первоначально в порции сыворотки определяют общие титры АТ (например, в РИГА) затем в неё вносят унитиол и после инкубации снова определяют титры АТ. Разницу между титрами первого и второго измерения составляют титры IgM.

Ход работы.

Постановка основных серологических реакций

Реакция преципитации (РП). Исследуют пробы кожи на сибирскую язву. Пробы предварительно простерилизованы в автоклаве.

Компоненты реакции: кусочек кожи измельчают. 1 г полученной массы помещают в пробирку, заливают 10 мл физраствора и 30-40 мин кипятят в водяной бане (горячий способ постановки реакции). Другой

вариант: 1 г измельченной кожи растирают в ступке с песком, заливают 0,3%-ным карболизированным физраствором (1:10) и 16-18 ч настаивают при комнатной температуре (холодный способ). Экстракт, который может содержать сибиреязвенный антиген (преципитиноген), фильтруют через асбестовую вату до полной прозрачности. Второй компонент - биофабричная преципитирующая сибиреязвенная сыворотка. Перед постановкой реакции ее фильтруют.

Постановка реакции. Мерной пипеткой наливают в специальные преципитационные пробирки по 0,20,3 мл преципитирующей сыворотки. Затем пастеровской пипеткой осторожно по стенке пробирки наслаивают на сыворотку исследуемый экстракт в таком же количестве (метод наслаивания). При использовании метода подслаивания в пробирки наливают исследуемый экстракт, а затем, опустив пастеровскую пипетку на дно пробирки, подслаивают под него преципитирующую сыворотку. Реакция считается положительной, если в течение первых 15 мин с момента ее постановки на границе соприкосновения экстракта и сыворотки образуется серовато-белое кольцо. Если это кольцо недостаточно резко выражено, реакцию оценивают как сомнительную, а при отсутствии кольца - как отрицательную;

Непосредственно перед постановкой реакции ставят контроли с ее компонентами: 1) сибиреязвенный антиген (биофабричный) + преципитирующая сыворотка - реакция должна быть положительной; 2) сибиреязвенный антиген + нормальная сыворотка лошади - реакция должна быть отрицательной; 3) физраствор + преципитирующая сыворотка - реакция должна быть отрицательной.

Реакция агглютинации (РА). Исследуют сыворотки крови животных на бруцеллез.

Компоненты реакции: пробы сывороток крови, единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК, цветной бруцеллезный антиген

для роз бенгал пробы, позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки, фенолизированный (0,5%-ный) физраствор.

Пластинчатая реакция агглютинации с бруцеллезным роз бенгал антигеном (РБП). Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18-30°C. С помощью шприца-полуавтомата или микропипетки вносят на дно лунок до 0,03 мл исследуемых сывороток. Затем в каждую лунку добавляют по 0,03 мл цветного антигена. При исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов и северных оленей достаточно 0,015 мл антигена. Антиген и сыворотки тщательно смешивают, распределяя полученную однородную смесь по всей поверхности лунки. Пластинку осторожно покачивают. Реакцию учитывают в течение 4 мин после смешивания сывороток с антигеном. При наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена, проявляющейся образованием розовых хлопьев, реакцию считают положительной, а при отсутствии агглютинации (смесь остается равномерно окрашенной) - отрицательной. Если кровь была доставлена из благополучных хозяйств, все сыворотки с положительной РБП не позже чем на следующий день исследуют в РА и РСК. Окончательная диагностическая оценка сомнительна только при положительной РБП и отрицательных РА и РСК. В остальных случаях она положительная. По аналогичной схеме оценивают результаты исследований сывороток крови крупного рогатого скота, буйволов, лошадей и верблюдов из неблагополучных хозяйств. Но овец, коз, свиней и северных оленей из таких хозяйств признают больными бруцеллезом при положительных результатах РБП без дополнительных исследований.

Перед постановкой РБП ставят контроль антигена с негативной и позитивной бруцеллезными сыворотками и контроль антигена на спонтанную агглютинацию: к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физраствора.

Классический (пробирочный) метод РА. Реакцию с сыворотками крови крупного рогатого скота проводят в объеме Г мл в разведениях 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400. Контроли: с негативной сывороткой в тех же разведениях и с позитивной бруцеллезной сывороткой до ее предельного титра.

Для исследования каждой сыворотки требуется 5 пробирок. В первую из них вносят 0,1 мл сыворотки и добавляют 2,4 мл физраствора (основное разведение 1:25). В третью, четвертую и пятую пробирки вливают по 0,5 мл физраствора. Затем из первой пробирки переносят во вторую и третью

разведения сыворотки. После смешивания 0,5 мл содержимого третьей пробирки переносят в четвертую и так же - из четвертой в пятую, после чего из пятой пробирки удаляют 0,5 мл полученной смеси. Затем во вторую, третью, четвертую и пятую пробирки добавляют по 0,5 мл антигена, разбавленного физраствором в соотношении 1:10. Так получают требуемые разведения сыворотки. В первую пробирку антиген не вносят (контроль качества сыворотки). Сыворотки разливают микропипеткой (с грушей), а при массовых исследованиях - групповыми дозаторами Флоринского.

Штатив с пробирками осторожно встряхивают, помещают на 16-20 ч в термостат при 37-38°C, затем в течение 1 ч выдерживают при комнатной температуре и проводят учет реакции.

Учет начинают с контролей. Ход реакции нормален, если в контроле с негативной сывороткой получен отрицательный результат, а с позитивной бруцеллезной сывороткой - положительный. Результаты определяют в крестах. Четыре креста (++++) - полное просветление жидкости и наличие ясно выраженного осадка в виде зонтика. При встряхивании пробирки зонтик разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100 % агглютинации). Три креста (+++) - неполное просветление жидкости и хорошо выраженный зонтик (75 % агглютинации). Два креста (++) - слабое просветление жидкости и умеренно выраженный зонтик (50 % агглютинации). Один крест (+) -

едва заметное просветление жидкости, зонтик выражен слабо (25 % агглютинации). Минус (—) - просветления жидкости нет, зонтик не образовался, на дне пробирки виден осадок в виде точки, при легком встряхивании пробирки образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два креста. У крупного рогатого скота бруцеллез считают установленным при положительной РА в титре 1:200 и выше, т.е. при наличии в 1 мл сыворотки не менее 200 МЕ антител.

Реакция связывания комплемента (РСК). Сущность реакции. При добавлении к сыворотке, содержащей определенные антитела (в нашем примере - бруцеллезные), соответствующего антигена, а затем комплемента происходит соединение этих трех компонентов (бактериолитическая система). Факт указанного соединения выявляют при внесении в бактериолитическую систему второй, гемолитической системы, состоящей из гемолизина и эритроцитов барана. При отсутствии в исследуемой сыворотке антител к примененному в реакции антигену произойдет гемолиз эритроцитов, так как комплемент, не связавшийся в первой системе, соединится с гемолизином во второй, гемолитической системе.

Компоненты реакции: испытуемая и контрольные (негативная и позитивная бруцеллезная) сыворотки крови крупного рогатого скота; антиген бруцеллезный, единый для РА, РСК и РДСК в рабочем титре, указанном предприятием-изготовителем; комплемент - свежая, консервированная или сухая сыворотка крови морской свинки; гемолитическая сыворотка (гемолизин) в удвоенном титре, указанном изготовителем; эритроциты барана - 2,5%-ная (от осадка) взвесь в физрастворе; физраствор. В день постановки реакции испытуемую и контрольные сыворотки инактивируют в водяной бане при 60-62°C в течение 30 мин.

Перед постановкой главного опыта проводят титрование комплемента в гемолитической и бактериолитической системах. Периодически (один раз в три месяца и каждую новую серию) титруют и гемолизин.

Титрование гемолизина. Вначале готовят основное разведение гемолизина - 1:100 (0,1 мл гемолизина + 9,9 мл физраствора). Затем из основного готовят разведения 1:500; 1:1000 и т.д. до 1:4000 по следующей схеме:

<i>Основное разведение гемолизина 1:100, мл</i>	<i>Физиологический раствор, мл</i>	<i>Получаемое разведение</i>
0,4	1,6	1:500
0,1	0,9	1:1000
0,1	1,4	1:1500
0,1	1,9	1:2000
0,1	2,4	1:2500
0,1	2,9	1:3000
0,1	3,4	1:3500
0,1	3,9	1:4000

В пробирки вносят по 0,2 мл каждого разведения гемолизина и добавляют по 0,2 мл комплемента в разведении 1:20, по 0,2 мл 2,5%-ной взвеси эритроцитов, по 0,4 мл физраствора. Пробирки встряхивают, ставят в водяную баню при 37-38°C на 10 мин и затем учитывают результат. Титр гемолизина - его наименьшее количество, необходимое для полного гемолиза в течение 10 мин 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного 1:20. Рабочий титр должен быть в 2 раза выше.

Титрование комплемента в гемолитической системе. Комплемент в разведении 1:20 разливают в пробирки в дозах от 0,02 до 0,2 мл с интервалами по 0,02 мл. В каждую пробирку добавляют физраствор до объема 0,2 мл. Затем во все пробирки вносят по 0,2 мл гемолизина в удвоенном титре и по 0,2 мл 2,5%-ной взвеси эритроцитов. Следующий

этап - добавление физраствора по 0,4 мл. После встряхивания пробирки на 10 мин помещают в водяную баню при 37-38°C и учитывают результат. Титр комплемента - его наименьшее количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов.

Титрование комплемента в бактериолитической системе. Оно позволяет окончательно определить дозу комплемента для системы с испытуемой сывороткой и антигеном. Используют инактивированные позитивную бруцеллезную и негативную сыворотки. Их разводят физраствором 1:5 и разливают по 0,2 мл: каждую в два ряда по 10 пробирок. Затем в пробирки каждого ряда вносят комплемент, разведенный 1:20, в возрастающих дозах: от 0,02 до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл. Недостающее до 0,2 мл содержимое пробирок дополняют физраствором. После розлива комплемента в первый ряд пробирок с каждой сывороткой вносят по 0,2 мл антигена в рабочем разведении, а во второй ряд - по 0,2 мл физраствора. Пробирки встряхивают и на 20 мин ставят в водяную баню. Затем во все пробирки добавляют по 0,4 мл гемолитической системы (0,2 мл гемолизина в рабочем титре и 0,2 мл 2,5%-ной взвеси эритроцитов) и вновь ставят на 20 мин в водяную баню при 37-38°C. После этого учитывают результат. Титр комплемента в бактериолитической системе - его минимальное количество, вызывающее полный гемолиз взвеси эритроцитов в пробирках с негативной сывороткой с антигеном и без него, а также в пробирках с позитивной сывороткой без антигена при задержке гемолиза в пробирках с позитивной сывороткой с антигеном.

Проведение главного опыта. Испытуемую сыворотку исследуют в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль). Реакцию проводят в объеме 1 мл - каждый компонент берут в объеме 0,2 мл в установленном рабочем титре (разведении). Контроли главного опыта: негативная и позитивная бруцеллезная сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена; гемолитическая система (гемолизин и эритроциты по 0,2 мл и 0,6 мл физраствора).

После розлива компонентов бактериологической системы (сыворотка + антиген + комплемент) пробирки в течение 20 мин выдерживают в водяной бане. Затем разливают компоненты гемолитической системы и вновь на 20 мин помещают пробирки в водяную баню. Результаты реакции учитывают через 3-4 ч после извлечения штативов из водяной бани и оценивают в крестах: ++++ - отсутствие гемолиза; +++ - гемолиз 25 % эритроцитов; ++ - гемолиз 50 % эритроцитов; + - гемолиз 75 % эритроцитов; - (минус) - полный гемолиз эритроцитов, отсутствие осадка, интенсивное окрашивание жидкости гемоглобином. Реакцию признают положительной при задержке гемолиза на 2-4 креста в одном или двух разведениях испытуемой сыворотки и сомнительной - при задержке гемолиза с оценкой в один крест. При получении сомнительного результата сыворотки крови от соответствующих животных через 15-30 дней исследуют повторно. Если сомнительная РСК получена дважды, животных считают положительно реагирующими.

Лабораторная работа № 7.

Антибактериальные средства.

Ограничение жизнедеятельности бактерий.

Подавление роста или уничтожение патогенных бактерий осуществляют с помощью различных химических или физических факторов. Они оказывают **неизбирательное** (используются для обеззараживания помещений, бытовых предметов и медицинского инструментария и т.д.) или **избирательное** (применяются в качестве химиотерапевтических средств) **противомикробное действие**. Основу профилактики и борьбы с инфекциями составляют методы прямого (непосредственного) и косвенного (опосредованного) воздействия. Прямые методы включают комплекс физических и химических воздействий, направленных на уничтожение патогенов с помощью непосредственно повреждающих воздействий. В частности, **дезинфекция** позволяет значительно уменьшить число

патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды, а **стерилизация** - полностью их элиминировать. Дезинфекцию можно проводить постоянно с определённой периодичностью (**профилактическая дезинфекция**) либо при возникновении инфекционного заболевания или подозрении на него (**очаговая дезинфекция**). Наиболее распространённые типы дезинфектантов приведены в табл. 5.

Физические методы

1. Термическая обработка. Имеется множество вариантов, но термическая обработка применима лишь в отношении термоустойчивых материалов. Наиболее простые и доступные методы - **прокаливание** и **кипячение**.

Пастеризация. Метод позволяет эффективно уничтожить микроорганизмы инкубацией материала при 71,7°C в течение 15 с с последующим быстрым охлаждением (**быстрая пастеризация**). **Медленная пастеризация** подразумевает более длительную экспозицию (30 мин) при 60°C. Пастеризация не является стерилизующим методом, т.к. не все микроорганизмы чувствительны к подобным воздействиям, однако её широко применяют при обработке пищевых продуктов для профилактики многих кишечных инфекций, а также желудочно-кишечных форм туберкулёза и Q-лихорадки.

Основные типы различных дезинфицирующих агентов.

Таблица 5

Тип	Определение
Гермицид	Физический или химический агент, уничтожающий большинство вегетативных форм микроорганизмов, но не их спор (обычно применяют для обработки различных объектов)
Стерилиант	Химический агент, эффективно

	уничтожающий микроорганизмы и их споры
Спороцид	Обычно химический агент, уничтожающий споры бактерий и грибов
Фунгицид	Химический агент, уничтожающий грибы
Вирулицид	Химический агент, уничтожающий вирусы
Бактерицид	Химический агент, уничтожающий бактерии
Бактериостатик	Химический агент, ингибирующий рост бактерий
Санатор	Агент (обычно детергент), поддерживающий численность микроорганизмов на определённом уровне

Стерилизация сухим жаром. Проводят в сухожаровых шкафах при 160°C в течение 2 ч; метод позволяет эффективно уничтожать не только вегетирующие клетки (погибают в течение нескольких минут), но и споры микроорганизмов (необходима экспозиция в течение 2 ч). Подобные воздействия разрушают структуру большинства органических соединений и ведут к значительному испарению жидкостей.

Стерилизация текучим паром (автоклавирование) включает обработку влажным паром (121°C) под давлением (1,2-1,5 атм.); наиболее эффективна для стерилизации термостабильных жидкостей. Термоустойчивые споры микроорганизмов в подобных условиях погибают за 15 мин. Обработка значительных объёмов (более 500 мл) требует более длительной экспозиции. В бактериологических лабораториях для этих целей

используют **автоклавы** с горизонтальной или вертикальной загрузкой. Текущий пар нельзя применять для стерилизации сред, содержащих углеводы, молоко и желатин.

Тиндализация - метод дробной стерилизации при низких температурах (предложил *Тиндэлл*) - включает ежедневное прогревание сред при 56-58°C в течение 5-6 сут; основан на поочерёдном уничтожении вегетативных клеток, проросших спор. Основной недостаток - невозможность полной элиминации микроорганизмов, т.к. некоторые споры не успевают прорасти в указанных временных интервалах, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры. Метод используют для стерилизации сыворотки, асцитической жидкости и т.д.

2. Облучение электромагнитными волнами разной длины используют для дезинфекции, а также стерилизации **термолабильных материалов**.

Ультрафиолетовые (УФ) лучи (в первую очередь длиной 250 и 270 нм) воздействуют на нуклеиновые кислоты. Микробицидное действие основано на разрыве водородных связей и образовании димеров тимина в молекуле ДНК, что приводит к появлению нежизнеспособных мутантов. Применение УФО для стерилизации ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла.

γ- и рентгеновское излучение эффективно используется для стерилизации большинства материалов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. Облучение вызывает образование свободных радикалов, денатурирующих нуклеиновые кислоты и белки, что и приводит к гибели клетки. Метод широко используют для стерилизации пластмасс, перспективно применение для стерилизации пищевых продуктов.

Микроволновое излучение используют для быстрой повторной стерилизации длительно хранящихся сред. Стерилизующий эффект достигается за счёт быстрого подъёма температуры.

Ультразвук вызывает деполяризацию органоидов, микробных клеток и денатурацию составляющих их молекул (в результате местного нагревания).

3. Стерилизация фильтрованием через различные природные (например, каолин, инфузорная земля) или искусственные материалы обеспечивает эффективную элиминацию бактерий и эукариотических микроорганизмов в жидкостях и газах.

а. Мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм эффективно задерживают бактерии, но не их споры и вирусы, т.е. они не обеспечивают полной стерилизации жидкостей и газов.

б. На практике широкое применение метода фильтрации ограничивается вязкостью различных жидкостей, определяющей скорость их прохождения через фильтры.

Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов включают: 1) применение дезинфектантов и антисептиков, дающих неспецифический бактерицидный эффект; 2) использование антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов, проявляющих избирательное противомикробное действие.

1. Химические средства неспецифического действия, применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов, обозначают термином «**дезинфектанты**», а вещества, используемые для обработки живых тканей, - «**антисептики**». Дезинфицирующие средства оказывают в используемых концентрациях бактерицидное действие, а антисептики в зависимости от концентрации - бактериостатическое или бактерицидное. Подобные препараты обычно действуют быстро, легко растворимы в воде, при правильном применении не оказывают вредного воздействия на организм человека и достаточно дешевы.

Алкоголи, или **спирты** (этанол, изопропанол и др.). Как **антисептики** наиболее эффективны при использовании в виде 60-70% водных растворов. Спирты осаждают белки и вымывают липиды из клеточной стенки. При

правильном применении эффективны в отношении вегетирующих форм большинства бактерий. Следует помнить, что к их действию резистентны споры бактерий, грибы и вирусы.

Галогены и галогенсодержащие препараты (препараты йода и хлора) широко применяют как **дезинфектанты** и **антисептики**.

(1) **Йода спиртовой раствор** (5% в этаноле) применяют как антисептик для обработки неповреждённой кожи, а также при порезах и ссадинах. Взаимодействует с гидроксильными группами белков, нарушая их структуру.

(2) **Йодинол** (1% водный раствор содержит 0,1% йода, 0,3% калия йодида и 0,9% поливинилового спирта, замедляющего выделение йода) применяют при хроническом тонзиллите, гнойном отите, озёне, гнойных хирургических заболеваниях, трофических язвах, ожогах.

(3) **Йодонат** (водный раствор комплекса поверхностно-активного вещества с йодом) применяют в качестве антисептика только для обработки операционного поля как заменитель спиртового раствора йода.

(4) **Повидон-йод** (комплекс йода с поливинилпирролидоном) применяют для обработки кожи, вызывает гибель не только вегетативных форм, но и спор; его растворы могут загрязняться видами *Pseudomonas* и другими грамотрицательными бактериями. **Раствор Люголя** используют для обработки слизистых оболочек.

(5) **Газообразный хлор**, взаимодействуя с водой, образует хлорноватистую кислоту (HClO). Хлор оказывает выраженное бактерицидное действие на многие микроорганизмы; в присутствии органических веществ его противомикробное действие значительно уменьшается. **Хлорная известь** (5,25% NaClO) при растворении образует хлорноватистую кислоту; применяют для дезинфекции.

(6) **Хлорамин Б** (содержит 25-29% активного хлора) обладает антисептическими и дезодорирующими свойствами. Используют для обработки инфицированных ран (1,5-2% раствор), дезинфекции рук (0,25-

0,5%) и неметаллических инструментов. Для дезинфекции предметов ухода за больными и выделений при кишечных и воздушно-капельных инфекциях применяют 1-3% раствор, при туберкулёзной инфекции - 5 % раствор.

(7) **Пантоцид** выпускают в виде таблеток, содержащих 3 мг активного хлора. Применяют для обеззараживания питьевой воды: 1 таблетка на 0,5-0,75 л воды, экспозиция 15 мин, при этом не уничтожаются цисты простейших, например *Entamoeba histolytica*.

(8) **Хлоргексидина биглюконат** (гибитан) выпускается в виде 20% водного раствора; обладает сильным бактерицидным свойством, сохраняющимся в присутствии крови, гнойного отделяемого. Для обработки операционного поля, а также для стерилизации инструментов (в течение 5 мин) применяют 0,5% водно-спиртовой раствор, для обработки ран, ожогов - 0,5% водный раствор, для дезинфекции рук - 0,5% спиртовой или 1% водный растворы. Для дезинфекции помещений и оборудования применяют 0,1% водный раствор. 0,05% раствор в специальной упаковке из полимерного материала по 100 мл применяют для индивидуальной профилактики венерических заболеваний. Мазь «**Сибикорт**» (содержит 1% хлоргексидина и 1% гидрокортизона) применяют при экземе, дерматитах в качестве противовоспалительного и антибактериального средства.

Альдегиды алкилируют amino-, сульфгидрильные и карбоксильные группы белков и более низкомолекулярных органических соединений, вызывая гибель микроорганизмов. Их широко используют как **консерванты**. Наиболее известные - формальдегид (8%) и глутаровый альдегид (2-2,5%) - проявляют раздражающее действие (особенно пары), что ограничивает их широкое применение.

(1) **Раствор формальдегида** обладает дезинфицирующим и дезодорирующим свойствами. Применяют для мытья рук, дезинфекции инструментов, спринцеваний, обработки кожи ног при повышенной потливости. Входит в состав препаратов: **формидрон, мазь формалиновая**.

(2) **Лизоформ** - мыльный раствор формальдегида. Применяют для спринцеваний в гинекологической практике, для дезинфекции рук и помещений.

(3) **Гексаметилентетрамин** в кислой среде организма расщепляется с выделением формальдегида, который, выделяясь с мочой, оказывает антисептическое действие. Применяют при инфекционных процессах мочевыводящих и желчевыводящих путей, кожных заболеваниях. Входит в состав комбинированных препаратов: **кальцекс, уробесал**.

(4) **Циминаль** применяют для лечения пиодермии, трофических язв, ожогов, ран как дополнительное средство при лечении ран, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*.

(5) **Цимизоль** - аэрозольный препарат, применяемый для лечения гнойных кожных заболеваний, трофических язв, ожогов, пролежней. Оказывает также обезболивающее действие.

(6) **Цидипол** активен в отношении *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*. Применяют для индивидуальной профилактики венерических заболеваний у мужчин после случайных половых связей; препарат вводят в уретру и обрабатывают кожу гениталий. Противопоказан при острых заболеваниях уретры и половых органов.

Кислоты и щелочи

(1) **Борная кислота** обладает антисептической активностью. Наносят в виде растворов или порошка на кожу и слизистые оболочки, однако хорошее всасывание препарата и медленное выведение из организма ограничивают его применение.

(2) **Бензойная кислота** оказывает противомикробное и фунгицидное действие и находит применение в качестве антисептика, а также в качестве пищевого консерванта (0,1% раствор).

(3) **Уксусная кислота** в виде 0,25-2% раствора находит применение как антисептик для обработки наружного уха и орошения нижних отделов

мочевыводящих путей; особенно активна в отношении аэробных грамотрицательных бактерий (например, *Pseudomonas*).

(4) Салициловая кислота - антисептик, применяемый в спиртовых растворах (1-2%), присыпках, мазях, пастах (например, для лечения дерматомикозов в областях, подверженных трению); оказывает также в зависимости от концентрации отвлекающее, раздражающее и кератолитическое действие.

(5) Раствор аммиака [(нашатырный спирт (NH_4OH), содержит 9,5-10,5% аммиака)] относят к антисептикам из группы щелочей. Применяют для обработки рук хирурга (0,5% раствор)

Тяжёлые металлы. Их антимикробный эффект основан на способности осаждать белки и прочие органические соединения. В качестве антисептиков широко используют нитрат серебра (ляпис), сульфат меди (медный купорос) и хромат ртути (мербромин). Не рекомендуют применять для дезинфекции соединения свинца, мышьяка и ртути, т.к. они способны аккумулироваться в организме человека.

(1) Ртутный дихлорид (сулема). Высокотоксичный препарат, всасывается через кожу. Иногда используют для дезинфекции белья, одежды, предметов ухода за больными, не применяют для дезинфекции металлических предметов.

(2) Серебряный нитрат (ляпис). В небольших концентрациях обладает вяжущим и противовоспалительным свойствами, в высоких - прижигающим. Оказывает бактерицидное действие. Применяют при эрозиях, язвах, избыточных грануляциях, конъюнктивите, трахоме, гиперпластическом ларингите.

(3) Протаргол. Содержит 7,8-8,3% серебра. Применяют для смазывания слизистых оболочек верхних дыхательных путей, промывания уретры и мочевого пузыря, при конъюнктивите, блефарите, бленнорее.

(4) **Колларгол.** Коллоидный раствор, содержащий 70% серебра. Применяют для промывания гнойных ран, уретры и мочевого пузыря, для лечения конъюнктивитов,

(5) **Меди сульфат** (медный купорос). Используют в виде 0,25% раствора при конъюнктивитах, для промывания при уретритах и вагинитах.

(6) **Цинка окись.** Применяют в виде присыпок, мазей, паст как вяжущее, подсушивающее и дезинфицирующее средство при кожных заболеваниях.

(7) **Свинцовый пластырь** (простой и сложный). Используют при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи.

Фенолы и их замещённые производные широко применяют как дезинфектанты, в меньших концентрациях - как эффективные антисептики. Препараты денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки. От применения непосредственно фенола отказались достаточно давно, но его производные (например, резорцин, хлорофен, тимол, салол) применяют сравнительно часто. Гексахлорофен наиболее активен в отношении стафилококков.

(1) **Фенол** (карболовая кислота) применяют для дезинфекции помещений, дезинсекции. Легко всасывается через кожу и может вызвать токсические явления: головокружение, слабость, нарушение дыхания, коллапс.

(2) **Трикрезол** применяют вместо фенола, а также для консервации инъекционных растворов.

(3) **Резорцин** применяют при кожных заболеваниях (экзема, себорея, зуд, грибковые заболевания) в виде водных или спиртовых растворов, мазей.

Катионные детергенты оказывают бактерицидное действие, связанное с изменением проницаемости цитоплазматической мембраны. Их эффект уменьшают анионные поверхностно-активные вещества (следовательно, они несовместимы с мылами), низкие значения pH, некоторые органические соединения и ионы металлов. Катионные

детергенты также адсорбируются в значительной степени пористыми и волокнистыми материалами. При нанесении на кожу они образуют плёнку, под которой могут оставаться живые микроорганизмы.

(1) **Циригель** применяют для обработки рук перед хирургическими операциями: наносят препарат на сухие руки и растирают по всей коже кистей и нижней части предплечья. После высушивания на коже остаётся тонкая плёнка, которую затем снимают этиловым спиртом.

(2) **Дегмицид** используют в виде 1 % раствора для обработки рук (по 3 мин обрабатывают руки 2 тампонами, смоченными раствором дегмицида) и операционного поля.

(3) **Этоний** обладает бактерицидным и бактериостатическим свойствами, оказывает инактивирующее действие на токсин стафилококка, местноанестезирующее действие, стимулирует заживление ран. Применяют при трофических язвах, трещинах сосков, зудящих дерматозах, язвах роговицы, кератитах.

(4) **Роккал** применяют в качестве антисептика для обработки рук хирурга, операционного поля и ран, дезинфекции инструментов и помещений.

Газы как дезинфектанты известны с глубокой древности. В частности, двуокись серы широко использовали для обработки складов и предохранения пищевых продуктов ещё в античности. Не менее широкое распространение получила **дератизация двуокисью серы**. Для уничтожения спор микроорганизмов при стерилизации предметов из пластмасс используют окиси этилена и пропилена под давлением при 30-60°C. Метод позволяет эффективно уничтожать большинство микроорганизмов, в том числе в тканях и жидкостях (кровь, гнойное отделяемое). Механизм действия обусловлен способностью окиси этилена алкилировать белки, что приводит к блокаде реакционных групп промежуточных продуктов обмена. В частности, повреждаются сульфгидрильные группы вегетативных форм и карбоксильные группы оболочек спор.

В качестве антисептиков давно и эффективно применяют различные **красители** (например, бриллиантовый зелёный, метиленовый синий, риванол или основной фуксин).

(1) **Метиленовый синий.** В виде 1-3% раствора применяют местно при ожогах, пиодермии, фолликулитах, в виде 0,2% раствора - для промывания мочевого пузыря.

(2) **Бриллиантовый зелёный** используют при гнойных заболеваниях кожи. Входит в состав жидкости *Новикова*.

(3) **Этакридина лактат** применяют для обработки ран (0,05-0,2% раствор), промывания плевральных и брюшной полостей, полости суставов, мочевого пузыря (0,05-0,1%), для промывания полости матки в послеродовом периоде (0,1 %), полоскания полости рта и глотки (0,1%), смазывания слизистых оболочек (1%). Действие развивается медленно. Активен в отношении кокков.

Окислители. Механизм антимикробной активности связан с окислением метаболитов и ферментов микроорганизмов либо денатурацией последних.

(1) **Раствор перекиси водорода концентрированный** (пергидроль). Содержит 27,5-31% перекиси водорода. Применяют в виде раствора для полосканий и смазываний при ангинах, стоматитах, для лечения гнойных ран. В дерматологии применяют в качестве депигментирующего средства.

(2) **Раствор перекиси водорода** содержит 3% H_2O_2 . Применяют в основном для полоскания полости рта и очистки ран, можно использовать для дезинфекции контактных линз. Препарат обладает также дезодорирующим свойством.

(3) **Гидроперит.** Комплексное соединение перекиси водорода с мочевиной. Содержит около 35% H_2O_2 . Для приготовления раствора, соответствующего приблизительно 1% раствору H_2O_2 , 2 таблетки [1 таблетка соответствует 15 мл 3% раствора перекиси водорода (0,45 г)] растворяют в 100 мл воды.

(4) **Калия перманганат** образует тёмно-фиолетовые водные растворы, способные окрашивать ткани и одежду в коричневый цвет. Растворы калия перманганат, в разведении 1:5000-1:10 000 в течение 1 ч вызывают гибель многих микроорганизмов. Применяют для промывания ран (0,1-0,5% растворы), полоскания полости рта и горла (0,01-0,1%).

Прочие препараты

(1) **Дёготь берёзовый** содержит фенол, толуол, ксилол, смолы и другие вещества. Оказывает антимикробное, инсектицидное, раздражающее действие. Входит в состав мази *Уилкинсона*, линимента бальзамического по *Л.В. Вишневскому*.

(2) **Ихтиол** содержит 10,5% органически связанной серы. Обладает противовоспалительным, местноанестезирующим и слабо выраженным антисептическим свойствами.

(3) **Хлорофиллипт** - смесь хлорофиллов, содержащихся в листьях эвкалипта (*Eucalyptus globulus*) семейства миртовых (*Myrtaceae*). Применяют местно при лечении ожогов и трофических язв. 1% спиртовой и 2% масляный растворы используют при эрозии шейки матки, внутрь принимают при носительстве стафилококка, внутривенно - при септических состояниях и пневмониях, в полость брюшины - при перитонитах.

Практические занятия. Аппаратура для проведения дезинфекции. Расчет потребности и приготовления рабочих растворов дезинфицирующих средств.

Защитная спецодежда

Аппаратура и механизированные установки, применяемые для дезинфекции. Для дезинфекционных работ используют разнообразную ветеринарно-санитарную технику: специализированные дезинфекционные машины, аппараты для дезинфекции аэрозолями, дезинфекционные камеры, аппаратуру для дезинфекции физическими методами и др.

Агрегат дезинфекционный автомобильный (АДА) предназначен для дезинфекции и дезинсекции в больших масштабах помещений холодными и горячими растворами, побелки помещений и их санитарной промывки, обеззараживания в дезинфекционной камере одежды, обуви и инвентаря, а также снятия с кожного покрова животных бактериальной или радиоактивной пыли.

АДА смонтирован на шасси ГАЗ-53А, имеет салон для бригады специалистов из 4 человек, емкости для дезинфицирующего раствора на 2000 л с топкой, емкость для маточного раствора на 2000 л и бак для аэрозольной жидкости на 100 л. В задней части машины расположены пароформалиновая камера вместимостью 2,5 м³, специальное устройство для обеспыливания кожного покрова животных и аэрозольный генератор.

Дезинфекционная установка системы Н.М. Комарова (ДУК) предназначена для дезинфекции и дезинсекции животноводческих помещений холодными и горячими растворами (рис. 13). Установка оборудована устройством для аэрозольной дезинфекции. Монтируют ее на шасси автомобиля ГАЗ-52. Имеет цистерну для раствора на 1000 л, котел для нагрева, емкости для маточных растворов, компрессорную установку.

Дезинфекционная установка ЛСД предназначена для дезинфекции животноводческих помещений холодными и горячими растворами, эмульсиями и суспензиями. Смонтирована на шасси автомобильного прицепа ГАЗ-704, имеет вихревой насос, создающий давление до 400-500 кПа (4-5 атм), резервуар для дезинфицирующей жидкости на 360 л, выбрасывающий рукав с распылителями, топку для подогрева дезинфицирующего раствора.

Ветеринарная дезинфекционная машина ВДМ смонтирована на шасси автомобиля УАЗ-469Б, имеет емкости для растворов на 400 л, вихревой насос, воздушный нагнетатель и два барабана с напорными шлангами по 20 м, а также приспособления для обеспыливания шерстного покрова животных.

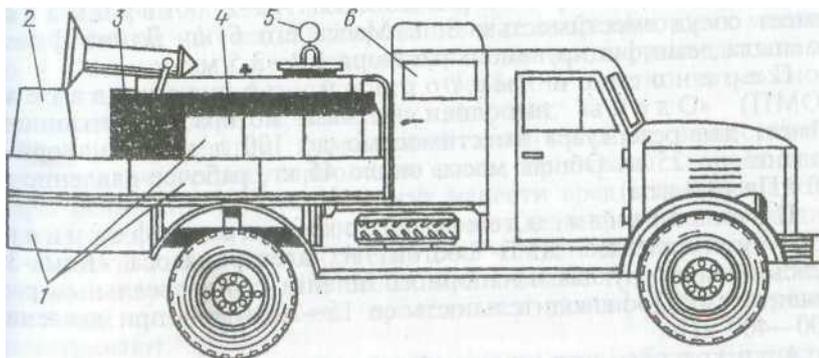


Рисунок 20. Дезинфекционная установка системы Н. М. Комарова (ДУК): 1 - ящики для шлангов, инструментов и пр.; 2- котел для подогрева воды и дезинфицирующего раствора; 3 - цистерна для воды или рабочего раствора; 4 - бачок для исходного Дезинфицирующего раствора; 5 - манометр для измерения давления; 6 - дополнительная кабина.

Установка дезинфекционная самоходная (УДС-2) смонтирована на электрокаре ЭП-006, имеет основной резервуар на 960 л и две емкости для маточного раствора по 53 л каждая, нагнетательный насос УН-41000 производительностью 85 л/мин. УДС-2 предназначена для крупных животноводческих комплексов. С ее помощью можно проводить гидроочистку помещений горячей или холодной водой, а также дезинфекцию и дезинсекцию.

Дезинфекционная передвижная установка (УДП-М) смонтирована на малогабаритной трехколесной тележке, имеет резервуар на 220 л и нагнетательный насос УН-41000 с электродвигателем мощностью 4 кВт. Предназначена для работ по гидроочистке, дезинфекции и дезинсекции помещений крупных промышленных комплексов с шириной проходов не менее 0,85 м.

Портативные дезинфекционные аппараты предназначены для обработки небольших по объему животноводческих помещений или отдельных зараженных объектов, участков в труднодоступных местах. Эти аппараты небольших габаритов и массы, чаще гидравлического или

пневматического действия, по исполнению бывают ранцевыми или напольными.

Ручной гидропульт «Костыль» представляет собой поршневой насос, оборудованный всасывающим рукавом с фильтром и напорным шлангом с распылителем. В зависимости от вида распылителя может давать сплошную струю дезраствора или распылительный факел.

Ручной аппарат «Север» УАРС по устройству и способу использования аналогичен гидропульту.

Ранцевый распылитель АО-2 «Автомаск» имеет сосуд вместимостью 8 л. Масса его 6 кг. Длина факела распыла дезинфицирующего раствора 1,2-3,5 м.

Переносной моторный опрыскиватель (ОМП) «Олень» выполнен на базе мотора от бензопилы. Имеет два резервуара вместимостью до 100 л и два напорных шланга по 25 м. Общая масса около 45 кг, рабочее давление до 80 кПа (0,8 атм).

Портативная электрическая дезинфекционная установка ДУБ состоит из электронасоса «Кама-3», всасывающего рукава и напорного шланга с универсальным распылителем. Производительность ее 15-20 л/мин при давлении 200-400 кПа.

Аппараты для получения дезинфекционных аэрозолей: форсунки (распылители), насадки, пистолеты-распылители, пневматические и дисковые аэрозольные генераторы. Форсунки бывают механическими (жидкость подается под давлением и распыляется, вытекая из небольшого отверстия), пневматическими (жидкость распыляется потоком воздуха) и дисковыми (жидкость разбрызгивается, срываясь с кромки быстровращающегося диска). Для дезинфекции в ветеринарной практике используют аэрозольные генераторы различных систем: САГ, ДАГ, ГГВАН, АГ-Л6 и др.

Дезинфекционные камеры. Различают три типа камер: горячевоздушные, паровые и газовые. Примером горячевоздушной камеры

является сушильный шкаф. Из паровых камер наиболее распространена паровая стационарная камера Крупина. Примером газовой камеры может служить пароформалиновая камера, в которой предметы подвергаются одновременному воздействию водяного пара и формалина. Пароформалиновую дезинфекцию можно применить и для обработки животноводческих помещений. Осуществляется она с помощью сосуда, куда наливают разведенный наполовину водой формалин. Сосуд помещают на подставку и подогревают снизу горелкой. Через отверстие в верхней части сосуда пары кипящего формалина поступают в помещение. Промышленность выпускает огневые паровоздушные пароформалиновые камеры (ОППК), монтируемые на автоприцепах.

Меры предосторожности при дезинфекции предусматривают предохранение людей, проводящих ее, а также животных от вредного действия химических веществ. Лица, осуществляющие дезинфекцию, должны быть обеспечены плотной спецодеждой (защитные очки, комбинезоны, капюшоны, резиновые перчатки и сапоги, халаты). При дезинфекции препаратами хлора и формалина работу выполняют в противогазах. При работе с растворами едких щелочей и кислот обязательно использование защитных очков. Чтобы избежать ожогов, не допускают попадания этих растворов на кожу и спецодежду.

При работе на специализированных дезинфекционных машинах и с аппаратами необходимо ознакомиться с руководством и соблюдать технику безопасности. Особенно опасно возможное превышение рабочего давления в аппаратах.

При дезинфекции помещений химическими веществами (едкая щелочь, серно-карболовая смесь, препараты хлора и растворы формалина), которые могут нанести вред сельскохозяйственным животным, последних на время дезинфекции необходимо вывести из помещения. Через 2-3 ч после дезинфекции кормушки и перегородки в стойлах моют водой. Перед

введением Животных помещение, где проводилась дезинфекция, хорошо проветривают.

В аптечке по оказанию скорой помощи при работе обязательно наличие нейтрализующих растворов для используемого дезинфицирующего средства.

Всякий раз после дезинфекции аппаратуру промывают чистой водой, особенно распылители, напорные рукава (шланги), трубопроводы и пульт распределения растворов. Это предохраняет от коррозии и возможной закупорки технологических протоков дезинфицирующих растворов.

Приготовление дезинфицирующих растворов. Нужно количество исходного дезинфицирующего вещества отвешивают или отмеривают мерной посудой. Затем взятое вещество осторожно растворяют при помешивании небольшими частями в сосуде с водой. После этого в сосуд доливают воду до необходимого объема. Хранить приготовленные растворы не рекомендуют, их необходимо сразу использовать.

Расчет потребности дезинфекционных средств. Вначале рассчитывают общую площадь помещений, подлежащих дезинфекции, включая площадь пола, стен, потолка, перегородок и поверхностей всех объектов, подлежащих увлажнению дезсредствами. Затем подсчитывают количество в литрах рабочего раствора, необходимого для дезинфекции. Для однократного орошения растворы дезинфицирующих средств обычно готовят из расчета 0,3-0,5 л/м суммарной площади помещений. Например, для коровника общей площадью 2400 м потребуются $(2400 \cdot 0,5) 1200$ л дезинфицирующего раствора.

В обоснованных случаях норму расхода растворов увеличивают в соответствии с действующими инструкциями при отдельных болезнях.

Концентрацию рабочих растворов дезинфицирующих средств определяют, исходя из цели дезинфекции (профилактическая или вынужденная) и принадлежности возбудителя болезни к группе по устойчивости в соответствии с приложением 1 действующей инструкции.

По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам возбудителей основных инфекционных болезней животных делят на четыре группы: малоустойчивые, устойчивые, высокоустойчивые и особо устойчивые.

Для первой и второй групп малоустойчивых возбудителей болезней используют наименьшую концентрацию дезинфицирующих веществ (едкий натр, формалин, хлорная известь, гипохлорит кальция и др. по 2 %). В этой же концентрации проводят профилактическую дезинфекцию.

Для третьей и четвертой групп высокоустойчивых возбудителей туберкулеза, сибирской язвы, анаэробных инфекций и др. концентрацию дезинфицирующих растворов увеличивают в 2-3 раза и более. По режимам четвертой группы проводят дезинфекцию при остропротекающих инфекционных болезнях невыясненной этиологии.

Расчет количества дезинфицирующего средства для приготовления намеченного объема (1200 л) заданной концентрации раствора (2%-ного) проводят с учетом содержания активнодействующего вещества по формуле

$$X = AB/C$$

где X - количество дезинфицирующего препарата, необходимое для приготовления раствора, кг; A - количество раствора, которое необходимо приготовить для дезинфекции, л; B - концентрация дезинфектанта по действующему веществу, нужная в растворе; C - содержание действующего вещества в препарате, %.

В нашем примере для дезинфекции коровника едким натром ($C = 100$) потребуется $(1200-2) : 100 = 24$ кг препарата, а хлорной извести ($C = 25$) $(1200-2) : 25 = 96$ кг. Растворы дезинфекционных средств готовят в чистой емкости, которая не должна разрушаться от действия растворенных в ней дезинфектантов. Малые объемы дезсредств удобно готовить в стеклянной или эмалированной посуде, большие - в металлических или деревянных бочках или емкостях.

При необходимости приготовления больших объемов дезинфицирующих растворов вначале готовят маточный концентрированный 10 - 20%-ный или 30%-ный раствор по действующему веществу. Из маточного раствора непосредственно перед дезинфекцией делают рабочий раствор, для чего добавляют воду при помешивании из расчета 1:5, 1:10 или 1:15.

Для приготовления 1200 л 2%-ного раствора едкого натра взвешивают 24 кг препарата и растворяют его вначале в 120 л воды в металлической бочке (20%-ный раствор). В холодной воде жидкий натр долго растворяется, поэтому лучше использовать горячую (70-80°C) воду. Для лучшего растворения практические ветеринарные специалисты добавляют в качестве катализатора отслужившие алюминиевые изделия: поршни машин, посуду, проволоку и др. Затем берут один объем этого концентрированного раствора и разбавляют 9 объемами воды в другой емкости (соотношение 1:10).

Для получения 100 л 2%-ного раствора формальдегида необходимо взять 5 л 40%-ного формалина и 95 л воды.

Для получения 10%-ного известкового молока берут 1 кг негашеной извести, гасят ее в 1 л воды, а затем добавляют 9 л воды.

Для приготовления 100 л раствора хлорной извести с содержанием в растворе 2 % активного хлора нужно взять 8 кг хлорной извести, содержащей 25 % хлора, и вначале добавить небольшое количество воды до получения кашицеобразной массы, чтобы не было комков. Потом при помешивании добавляют остальное количество воды до 100 л. Взвесь отстаивают в течение суток в закрытой емкости. Осветленный слой используют для дезинфекции.

Организация и техника проведения дезинфекции различных объектов. Перед началом дезинфекции животных удаляют из помещений, проводят механическую очистку и приступают к дезинфекционным работам.

Механическая очистка помещений включает в себя удаление навоза, грязи, мусора и прочих нечистот из помещений и с окружающей

территории. Для этого используют лопаты, метлы, грабли, скребки, щетки и т. д. Механическую очистку производят в такой последовательности:

- 1) навоз, подстилку, мусор и т. п. увлажняют водой, а при наличии инфекционной болезни дезинфицирующим раствором;
- 2) увлажняют пол, стены, кормушки, перегородки;
- 3) щетками или метлами, смоченными дезинфицирующим раствором, удаляют пыль, паутину и пр. с потолка, стен, кормушек, перегородок, столбов и предметов внутреннего оборудования;
- 4) тщательно очищают пол помещения и сточные желоба от навоза и грязи;
- 5) навоз, остатки корма, мусор в зависимости от характера инфекционной болезни обезвреживают биотермическим методом или химическими веществами.

При сибирской язве и некоторых других болезнях навоз сжигают.

Дезинфекция помещений. Выбор дезинфицирующего средства зависит от объекта дезинфекции, а также от характера заразной болезни. Средства, рекомендуемые для дезинфекции при отдельных заразных болезнях, приведены в действующей инструкции.

Дезинфицирующий раствор наносят в следующем порядке: вначале дезинфицируют пол, затем орошают стены и все перегородки, не допуская пропусков. После этого обрабатывают потолок. Его дезинфицируют в последнюю очередь, чтобы капли раствора не попадали на одежду рабочего. Обрабатывают также кормушки, ясли, внутреннее оборудование помещений и все предметы, при помощи которых производили механическую очистку (лопаты, грабли, метлы и т. п.). В заключение повторно дезинфицируют пол. Помещение закрывают на 2-3 ч, а затем проветривают.

Дезинфекция спецодежды и предметов. Спецодежду дезинфицируют парами или аэрозолями формальдегида, методом замачивания в дезинфицирующих растворах, кипячением или текучим паром, а также автоклавированием.

Парами формальдегида обеззараживают изделия из хлопчатобумажных и синтетических тканей, кожи, резины, брезента, войлока, меха, металлов и дерева.

Для обеззараживания спецодежды, снаряжения и предметов методом замачивания применяют растворы хлорамина, формалина и фенола. Изделия из металлов (инвентарь для уборки и т. п.) дезинфицируют путем погружения их на 30-60 мин в один из растворов, используемых для дезинфекции помещений.

Обеззараживание спецодежды кипячением проводят в 1%-ном растворе кальцинированной соды в течение 30 мин при неспорообразующих микроорганизмах и 90 мин для уничтожения споровой микрофлоры. Спецодежду, загрязненную кровью, перед кипячением или автоклавированием замачивают в холодной воде с добавлением 2 % кальцинированной соды. Экспозиция 2 ч.

Стирку и профилактическую дезинфекцию спецодежды не реже одного раза в неделю.

Обувь дезинфицируют каждый раз при входе и выходе из лаборатории на дезковриках.

Кожаную обувь, протирая 3%-ным раствором фенола или указанным раствором с добавлением сулемы 1:1000.

Дезинфекция почвы. Для дезинфекции поверхностных слоев почвы применяют взвесь хлорной извести с содержанием 5 % активного хлора, 4%-ный раствор формалина, 18%-ную эмульсию феносмолина, 10%-ный раствор серно-карболовой смеси или едкого натра из расчета 10 л раствора на 1 м площади.

При споровой микрофлоре почву пропитывают одним из указанных растворов, а затем то место, где лежал труп животного, перекапывают на глубину 25 см, смешивая землю с сухой хлорной известью из расчета 3 части почвы на 1 часть извести. При неспоровой микрофлоре землю перекапывают и смешивают с сухой хлорной известью из расчета 5 кг

известны на 1 м площади. При перемешивании с известью почву увлажняют. О проведенной дезинфекции составляют акт.

Бактериологический контроль качества дезинфекции. Качество дезинфекции определяют по наличию или отсутствию санитарно-показательных микроорганизмов: кишечной палочки, стафилококков или спорообразующих аэробов на поверхности обеззараживаемых объектов. Присутствие этих микробов после дезинфекции свидетельствует о неудовлетворительно проведенном обеззараживании объекта, а их отсутствие - о качественно проведенной дезинфекции.

По наличию или отсутствию кишечной палочки определяют качество дезинфекции при неспорообразующих бактериальных (кроме туберкулеза) и вирусных болезнях. По наличию или отсутствию стафилококков контролируют качество дезинфекции при туберкулезе, болезнях, вызываемых спорообразующими микроорганизмами, и экзотических.

Для бактериологического контроля с разных участков поверхности дезинфицированного объекта берут пробы стерильными ватными тампонами, смоченными в стерильном нейтрализующем используемый дезинфектант растворе. Пробы (смывы, отпечатки, соскобы) берут с 10 - 20 различных участков поверхности дезинфицированных помещений или объектов. Участки площадью 10 x 10 см тщательно протирают тампонами, после чего их помещают в пробирки с нейтрализующей жидкостью. Нейтрализующими служат: раствор гипосульфита для хлорсодержащих дезинфектантов; раствор уксусной кислоты для щелочей; раствор аммиака для формалина; раствор бикарбоната натрия для кислот и перекиси водорода. Нейтрализующие растворы готовят в концентрациях в 10 раз меньших, чем концентрация использованного дезинфицирующего вещества.

Пробы доставляют в лаборатории в течение 3 - 6 ч с момента отбора. Выделение и индикацию санитарно-показательных микроорганизмов в лаборатории проводят на специальных или селективных питательных средах.

Правила утилизации и уничтожения пищевой продукции, представляющей опасность жизни и здоровью человека и животных, окружающей среде.

1. В настоящих правилах используются следующие понятия:

- опасная пищевая продукция - продукция, при использовании которой может возникнуть недопустимый риск жизни и здоровью человека и окружающей среде;

- уничтожение опасной пищевой продукции - воздействие на пищевую продукцию, непригодную к употреблению и (или) дальнейшей переработке, исключающее ее использование для пищевых целей и доступ к ней человека и животных;

- утилизация пищевой продукции - технологическая переработка пищевой продукции, непригодной для использования по целевому назначению, в другую пищевую продукцию.

2. Пищевой продукцией, представляющей опасность жизни и здоровью человека и животных, окружающей среде (далее - опасная пищевая продукция) признается продукция:

1) не соответствующая требованиям безопасности, установленным санитарно-эпидемиологическими правилами и нормами, гигиеническими нормативами, а также ветеринарными (ветеринарно-санитарными) правилами и ветеринарными нормативами;

2) имеющая явные признаки недоброкачества (порча, разложение, загрязнение);

3) не имеющая документов производителя (поставщика) пищевой продукции, подтверждающих ее происхождение, безопасность, оформленных в установленном порядке;

4) свойства, которой не соответствуют данному виду и наименованию пищевой продукции;

5) маркировка, которой не соответствует требованиям нормативной и технической документации;

б) с неустановленным сроком годности для пищевой продукции, на которую такой срок должен быть установлен, или с истекшим сроком годности;

7) фальсифицированная пищевая продукция.

3. Опасность пищевой продукции устанавливается посредством проведения санитарно-эпидемиологической или ветеринарно-санитарной экспертизы следующими путями:

1) оценки соответствия сопроводительной документации на пищевую продукцию требованиям нормативной и технической документации;

2) внешнего визуального осмотра пищевой продукции, состояния упаковки и маркировки продукции;

3) проведения лабораторных исследований (санитарно-эпидемиологическая, ветеринарно-санитарная экспертизы).

4. В случае если по результатам проведенной экспертизы государственным органом выдано заключение о возможности использования пищевой продукции после ее утилизации с соблюдением определенных требований и технологий, такая пищевая продукция подлежит утилизации.

5. Пищевая продукция, подлежащая по результатам экспертизы утилизации, подвергается технологической переработке с целью:

- получения сырья;
- обеззараживания (проварки, стерилизации, замораживания, посола, кипячения и др.);
- промышленной переработки (выработки вареных колбас до достижения внутри батона температуры не менее 75 °С, мясных хлебов, консервов, вытопки жира и др.);
- получения кормов животным; технической утилизации (получение мясо-костной, рыбной муки).

6. Решение о возможности использования опасной пищевой продукции после ее утилизации в качестве корма животным принимается органами

государственного ветеринарно-санитарного контроля по согласованию с органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

7. Решение о запрещении производства или оборота опасной пищевой продукции принимается государственным органом, выявившим опасную продукцию, в соответствии с компетенцией и в порядке, установленном законодательством государства.

8. Производитель, продавец (далее - владелец) опасной пищевой продукции выводит ее из производства или оборота для утилизации или уничтожения самостоятельно или на основании предписания государственных органов.

9. Опасная пищевая продукция неизвестного происхождения или бесхозная, имеющая явные признаки недоброкачества, представляющая непосредственную угрозу жизни и здоровью человека и животных, выводится из оборота без проведения экспертизы самостоятельно владельцем, либо государственными органами.

10. Опасная пищевая продукция на период необходимый для проведения экспертизы, принятия и исполнения решения о дальнейшей ее утилизации или уничтожении, находится на временном хранении в специально выделенных складских помещениях, при необходимости в холодильнике (изолированной камере) владельца с соблюдением условий, исключающих к ней доступ. Продукция, помещаемая на временное хранение, подлежит строгому учету. Предельный срок временного хранения опасной пищевой продукции устанавливается не более двух месяцев.

11. В случае если по результатам проведенной экспертизы государственным органом выдано заключение о несоответствии пищевой продукции требованиям нормативно-правовых и нормативных актов и признании ее опасной, такая пищевая продукция подлежит комиссионному уничтожению.

12. Для уничтожения опасной пищевой продукции при органах государственного санитарно-эпидемиологического надзора и ветеринарно-

санитарного контроля создаются комиссии, куда входят представители органов охраны окружающей среды, неправительственных организаций и ассоциаций (союзов) субъектов частного предпринимательства (далее - комиссия).

13. С учетом результатов экспертизы комиссия в течение пяти рабочих дней со дня получения заключения экспертизы принимает решение об уничтожении опасной пищевой продукции с указанием способа и места уничтожения. До принятия решения комиссией по инициативе и за счет средств владельца пищевой продукции может быть проведена дополнительная лабораторная экспертиза опасной пищевой продукции в лабораториях, аккредитованных (аттестованных) в порядке, установленном законодательством страны.

14. Если, ввозимая на территорию государства пищевая продукция признана опасной на этапе таможенного оформления, такая пищевая продукция подлежит вывозу за пределы страны или помещается под таможенный режим уничтожения товаров в соответствии с таможенным законодательством государства. Факт вывоза опасной пищевой продукции за пределы страны подтверждается грузовой таможенной декларацией, оформленной в установленном порядке, с наличием отметки таможенного органа о ее вывозе, которая предъявляется государственному органу, выявившему опасную пищевую продукцию.

15. Транспортировка опасной пищевой продукции к месту уничтожения осуществляется в сопровождении сотрудников органов внутренних дел, при помещении товара под таможенный режим уничтожения товаров - сотрудников таможенных органов.

16. Расходы, связанные с транспортировкой опасной пищевой продукции, ее хранением, утилизацией и уничтожением несет владелец продукции, либо лицо, заявившее таможенный режим уничтожения товаров.

17. Уничтожение опасной пищевой продукции осуществляется с соблюдением обязательных требований законодательства в области охраны

окружающей среды и санитарно-эпидемиологического благополучия населения технически доступным способом (термическим, химическим, механическим, биологическим, иным способом воздействия), в результате которого полностью уничтожаются или теряются ее потребительские свойства.

18. Пищевая продукция, инфицированная возбудителями болезнетворных микроорганизмов, перед уничтожением или в процессе уничтожения подвергается обеззараживанию в соответствии с действующими нормативными правовыми актами.

19. Пищевая продукция, представляющая радиационную опасность подлежит захоронению в порядке, установленном законодательством страны.

20. Место уничтожения (захоронения) опасной пищевой продукции определяется местными исполнительными органами области (города республиканского значения, столицы), районов (городов областного значения) по согласованию с органами государственного санитарно-эпидемиологического надзора и охраны окружающей среды.

21. Уничтожение опасной пищевой продукции производится владельцем при обязательном присутствии членов Комиссии и оформляется актом, по форме, согласно приложению к настоящим Правилам. Решение Комиссии об уничтожении опасной пищевой продукции может быть обжаловано в порядке, установленном законодательством страны. Владелец обеспечивает сохранность опасной пищевой продукции, находящейся на временном хранении и несет ответственность за ее дальнейшую утилизацию или уничтожение в порядке, установленном законодательством страны.

Составление акта о дезинфекции. О проведении дезинфекции составляют акт по установленной форме. В акте отражают: дату дезинфекции; наименование фермы, населенного пункта и хозяйства; фамилии, имена и отчества санитарных специалистов, проводивших дезинфекцию; вид дезинфекции, площадь и объекты дезинфекции, метод ее

проведения; вид и концентрацию дезинфицирующего средства, а также условия проведения дезинфекции и расход дезинфектанта. Акт подписывают ветеринарные специалисты, проводившие дезинфекцию.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоят меры личной профилактики при работе с патологическим материалом, культурами микроорганизмов и животными, больными инфекционными болезнями?
2. Каковы основные правила взятия крови у лабораторных животных?
3. В чем заключаются задачи бактериологических исследований?
4. Каково устройство микроскопа и правила работы с ним?
5. Какие виды микроскопии вы знаете?
6. Какие вы знаете питательные среды и способы их приготовления?
7. Каковы техника посевов и пересевов микроорганизмов, получения чистых культур?
8. Какие вы знаете питательные среды и способы их изготовления?
9. Каковы общие правила при отборе проб, транспортировке, приемке, хранении и обеззараживании лабораторных образцов?
10. Методы исследований и обработка результатов?
11. Основные методы идентификации микроорганизмов?
12. Правила приготовления чистых культур?
13. Биохимические методы индикации бактерий?
14. Какие средства специфической профилактики вам известны?
15. Что такое иммунодиагностика?
16. Принципы основных серологических реакций?
17. Какова сущность реакций агглютинации и преципитации?
18. Что такое полимеразная цепная реакция, на каком принципе она основана?
19. Перечислите основные антибактериальные средства?
20. Какую аппаратуру для проведения дезинфекции вы знаете?

21. Каким образом провести расчет потребности и приготовления рабочих растворов дезинфицирующих средств?

22. Как приготовить и окрасить мазки из культур микробов, из патологического материала?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ОСНОВНАЯ:

1. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология/ Л.Б. Борисов. - М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2002. - 736 с.
2. Галынкин, В. А. Дезинфекция и антисептика в промышленности и медицине [Текст]: монография / В. А. Галынкин [и др.]. - СПб. : Фолиант, 2004. - 95 с.
3. Галынкин, В. А. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии с основами асептики и биотехнологии : учеб. пособие / В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, Т. С. Потехина ; Санкт-Петерб. гос. хим. фармац. акад. - Курск : Изд-во КГМУ, 2002. - 234 с.
4. Заикина, Н. А. Иммунобиотехнология [Текст] : учеб. пособие / Н. А. Заикина, В. А. Галынкин, А. В. Гарабаджиу. - СПб. : Изд-во "Менделеев", 2005. - 155 с.
5. Козлова, В.И. Вирусные хламидийные и микоплазмсен-ные заболевания гениталий / В.И. Козлова, А.Ф. Пухнер; Руководство для врачей. Изд-е 5-е, обновленное и дополненное. - СПб.: Изд-во «Ольга», 2000.- 572с.
6. Инфекционные болезни: Учеб. пособие для вузов. Под ред. Е.П. Шуваловой / серия «Учебники и учебные пособия» - Ростов н/Д.: Изд-во «Феникс», 2001. – 960 с.
7. Павлович, С.А. Медицинская микробиология / С.А. Павлович; 4-е изд., стер. – Мн: Выш.шк., 2000. – 133 с.
8. СП 1.2.731-99. Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. - Введ. 01.05.2008. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России ISBN: 5-7508-0157-8, 1999. - 107 с.
9. ISO 6887-3:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3.

Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов. Введ. 01.03.2003. - М.: Стандартиформ, 2012. -11 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ:

10. Букринская, А.Г. Вирусология / А.Г. Букринская. - М.: Медицина, 1986. – 336 с.
11. Дроздов, С.Г. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях / С.Г. Дроздов, Н.С. Гарин, Л.С. Джиндоян и др. - М.: Медицина, 1987. - 256 с.
12. Езепчук, Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий / Ю.В. Езепчук. - М.: Медицина, 1977. – 108 с.
13. Паркер, М. Т. Внутрибольничные инфекции. Руководство по лабораторным методам исследования / М. Т. Паркер. - М.: Медицина, 1988. – 68 с.
14. Барбер, Х. К. Иммунобиология для практических врачей / Х.К. Барбер. - М.: Медицина, 1980. – 350 с.
15. Кашкин, П.Н. Биохимическая организация микробной клетки / П.Н. Кашкин, Ю.А. Любимов. - Ленинград: Лен-ГИДУВ, 1977. – 98 с.
16. Нейчев, С. Клиническая микробиология / С. Нейчев; пер. с болгарск. - София: Медицина и физкультура, 1977. – 350 с.
17. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунологи: Учебник / Л.Б. Борисов, А.М. Смирнова, И.С. Фрейдлин и др.; под ред. Л.Б. Борисова, А.М. Смирновой - М.: Медицина, 1994. - 528 с.
18. Маянский, А.Н. Микробиология для врачей (очерки патогенетической микробиологии) / А.Н. Маянский. - Нижний Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 1999. - 400 с.
19. Медицинская микробиология / Гл.ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. - М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. - 1200 с.
20. Тимаков, В.Д. Микробиология / В.Д. Тимаков, В. С. Левашов, Л. Б. Борисов. - М.: Медицина, 1983. - 511 с.

21. Петровская, В.Г. Микрофлора человека в норме и в патологии / В.Г. Петровская, О.П. Марко. - М.: Медицина, 1976. – 221 с.
22. Пешков, М.А. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней [Текст] / [М. А. Пешков [и др.] ; под общ. ред. К. И. Матвеева ; редкол.: Т. И. Буланова [и др.]. - Изд. 2-е, перераб. И доп. - М. : Медицина, 1973. - 624 с.
23. Ройт, А. Основы иммунологии / А. Ройт; Пер. с англ. - М.: Мир, 1991. - 328 с.

РЕЦЕНЗИЯ

**на методические указания к лабораторным работам по дисциплине
«Микробиология» для студентов
направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения"**

**Автор-составитель: доцент кафедры микробиологии и биохимии
Мурманского государственного технического университета Перетрухина
Инга Владимировна**

Рецензируемые методические указания «Микробиология» для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения" построено в соответствии с типовой рабочей программой и позволяет осуществить все основные работы, рекомендуемые типовой рабочей программой.

Методические указания представляют собой оригинальное современное указание для студентов технологических специальностей высших учебных заведений. Основная цель указаний - усвоение основных микробиологических методов, изучение устройства микробиологической лаборатории и оборудования.

В методических указаниях дано содержание и ход лабораторных работ по микробиологии. Лабораторные работы включают формулировку целей работы, краткие теоретические сведения, подготовительную часть, расчетные формулы, рисунки и таблицы. На основе данных методических указаний студенты смогут сориентироваться во всем объеме анализа и применить приобретенные знания в практической деятельности. Предлагаемая форма изложения заставляет студента думать, самостоятельно воспроизводить и наблюдать в лабораторных условиях микробиологические процессы. Методические указания включают теоретические основы и методологию микробиологии.

Методические указания могут быть использованы преподавателями и студентами для изучения общей и санитарной микробиологии.

Методические указания «Микробиология» для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения" составлены в соответствии с требованиями издательско-полиграфического центра МГТУ и могут быть рекомендованы для издания.

К.б.н., доцент кафедры
микробиологии и биохимии

Литвинова М.Ю.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ПРОТОКОЛ
заседания кафедры «Микробиология и биохимия»

№ 01

09.09.2013

Мурманск

Председатель – Макаревич Е. В.
Секретарь – Пашкина О. И.

Присутствовали:

Макаревич Е.В., зав.кафедрой, к.б.н.; Перетрухина А.Т., профессор, д.б.н.; Овчинникова С.И., профессор, к.х.н.; Кривенко О.Г., профессор, к.м.н.; Перетрухина И.В., доцент, к.б.н.; Быкова А.В., доцент, к.б.н.; Широкая Т.А., доцент; Богданова О.Ю., профессор, к.б.н.; Боденко В.М., зав. лабораторией; Ключко Е. В., зав. кабинетом медицинской подготовки; Михнюк О.В., старший преподаватель; Шкуратова Е.Б., старший преподаватель; Литвинова М.Ю., доцент; Блинова Е.И., ассистент; Шашкова Е. В., научный сотрудник; Луценко Е.С., младший научный сотрудник; Пашкина О. И., зав. лабораторией; Железкина Е.В., инженер; Узбекова О.Р. , инженер.

Повестка дня:

Утверждение методических указания к лабораторным работам по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения" очной формы обучения, автор-составитель: Перетрухина И.В.

СЛУШАЛИ: Об утверждении и рекомендации методических указаний к лабораторным работам по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения" автор-составитель: Перетрухина И.В.

РЕШИЛИ: Рекомендовать к изданию методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Микробиология» для студентов направления 260200.62 "Продукты питания животного происхождения", автор-составитель: Перетрухина И.В. в количестве 50 экземпляров.

ГОЛОСОВАЛИ: «За» - единогласно.

Председатель _____

Макаревич Е.В.

Секретарь _____

Пашкина О. И.

