

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

Институт биологии и природопользования  
Кафедра «Прикладная биология и микробиология»

**Сопрунова О.Б.**

**САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Учебное пособие**

Астрахань – 2007

Сопрунова О.Б.

Санитарная микробиология: Учебное пособие / АГТУ. – Астрахань, 2007 –204 с.

Учебное пособие предназначено для изучения теоретических аспектов, подготовки и проведения лабораторного практикума по санитарной микро-биологии. Освещаются основные методы санитарно-бактериологических ис-следований объектов окружающей среды (воды, почвы, воздуха, оборудова-ния, пищевых продуктов и др.). Основное внимание уделяется практической части, касающейся методов исследований. Все рекомендации по проведению санитарно-бактериологического анализа составлены в соответствии с действующими нормативными документами.

Учебное пособие введено в учебный процесс решением кафедры «При-кладная биология и микробиология» (протокол № 17 от 24 мая 2007 г.) для теоретической подготовки и осуществления лабораторного практикума по санитарной микробиологии студентами специальности 020209.65 «Микробио-логия», направления 020200.62 «Биология», магистерской программы 020212.68 «Микробиология и вирусология».

Рецензент:

Федорова Н.Н. - д.м.н., профессор кафедры «Общая экология и гидро-биология»

Учебное пособие утверждено методическим советом специальности 020209.65 «Микробиология» (протокол № 9 от 1 июня 2007 г.)

© Астраханский государственный технический университет, 2007

© О.Б. Сопрунова, 2007

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
Санитарная микробиология как наука.....	7
Принципы проведения санитарно-микробиологических исследований.....	9
Методы проведения санитарно-микробиологических исследований.....	10
Общая санитарная микробиология.....	11
Методы прямого обнаружения патогенных микроорганизмов.....	11
Методы косвенной идентификации.....	11
Определение общего микробного числа.....	12
Санитарно-показательные микроорганизмы.....	13
Группы санитарно-показательных микроорганизмов.....	14
Патогенные микроорганизмы в окружающей среде.....	20
Характеристика некоторых патогенных микроорганизмов.....	22
Грамположительные кокки.....	22
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
Микроорганизмы рода <i>Streptococcus</i> .....	25
Стрептококки группы А.....	26
Стрептококки группы В.....	28
<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	29
Негемолитические стрептококки.....	31
Бактерии рода <i>Enterococcus</i> .....	32
Анаэробные спорообразующие палочки.....	32
Спорообразующие бактерии рода <i>Clostridium</i> .....	34
<i>Clostridium perfringens</i> .....	35
<i>Clostridium botulinum</i> .....	41
Факультативно-анаэробные спорообразующие грамположительные палочки.....	46
Бактерии рода <i>Bacillus</i> .....	47
<i>Bacillus anthracis</i> .....	48
<i>Bacillus cereus</i> .....	54
Аэробные неферментирующие грамотрицательные палочки.....	55
Бактерии рода <i>Pseudomonas</i> .....	56
Факультативно-анаэробные грамотрицательные ферментирующие палочки.....	67
Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> .....	67
Бактерии рода <i>Escherichia</i> .....	68
Бактерии рода <i>Proteus</i> .....	72
Бактерии рода <i>Vibrio</i> .....	73
Специальная санитарная микробиология.....	78
Санитарно-микробиологическое исследование воды.....	78
Особенности санитарно-микробиологического контроля воды открытых водоемов.....	82
Особенности санитарно-микробиологического контроля качества питьевой воды.....	84

Санитарно-бактериологическое исследование воды плавательных бассейнов.....	86
Санитарно-бактериологическое исследование сточных вод.....	87
Санитарно-микробиологическое исследование почвы.....	88
Группы почвенных микроорганизмов.....	89
Индикаторные микроорганизмы для оценки санитарного состояния почв.....	90
Цели санитарно-микробиологического исследования почвы.....	91
Санитарно-микробиологическое исследование микрофлоры воздуха.....	96
Микрофлора воздуха.....	96
Условия циркуляции микроорганизмов в воздухе.....	102
Методы выделения микроорганизмов из воздуха.....	103
Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов.....	104
Санитарно-микробиологический анализ качества пищевых продуктов.....	106
Особенности микробиологии рыбы, рыбопродуктов и промысловых беспозвоночных.....	111
Особенности санитарно-микробиологического анализа консервов.....	125
Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода и рук персонала.....	127
Микробиота человека. Микрофлора полости рта.....	128
Медицинская биотехнология и генная инженерия. Микробиологические основы антимикробной профилактики.....	128
Учение об инфекции.....	133
Противомикробные мероприятия.....	143
Стерилизация.....	143
Дезинфекция.....	144
Антисептика.....	146
Асептика.....	147
Лабораторный практикум.....	148
Санитарно-бактериологический анализ воды.....	148
Санитарно-микробиологический анализ почвы.....	152
Санитарно-бактериологические исследования микрофлоры воздуха.....	154
Санитарно-микробиологический контроль пищевых продуктов.....	154
Санитарно-микробиологический анализ консервов.....	158
Санитарно-бактериологическое исследование молока.....	160
Микробиологический анализ сыра.....	166
Микробиологический анализ сливочного масла.....	168
Микробиологический анализ мяса.....	169
Санитарно-бактериологическое исследование кисломолочных продуктов.....	172
Санитарно-бактериологическое исследование свежих плодов и овощей.....	174
Санитарно-бактериологическое исследование мучной и крупяной продукции.....	175
Санитарно-микробиологическое исследование рук и рабочих поверхностей.....	177

Санитарно-микробиологический анализ микрофлоры ротовой полости...	178
Приложение. Среды, используемые в санитарной микробиологии.....	180
Контрольные вопросы.....	193
Словарь терминов.....	195
Список литературы.....	201

## ВВЕДЕНИЕ

Санитарная микробиология изучает микроорганизмы окружающей среды (воды, воздуха, почвы, продуктов питания и предметов обихода) и вызываемые их жизнедеятельностью процессы, которые косвенно или непосредственно оказывают влияние на здоровье людей и окружающую среду.

Основные задачи санитарной микробиологии:

- Изучение биоценозов, в которых существуют микроорганизмы, патогенные для человека, и изучение его роли в их накоплении.

- Разработка, совершенствование и оценка методов микробиологических исследований объектов окружающей среды – воды, воздуха, почвы, предметов обихода, пищевых продуктов.

- Выработка нормативов, определяющих соответствие микробных ценозов исследуемых объектов гигиеническим требованиям; совершенствование санитарного законодательства, способствующего охране объектов окружающей среды от загрязнения.

- Оценка путей воздействия человека и животных на окружающую среду. При этом особое внимание уделяется изучению: нарушений процессов естественного самоочищения различных объектов окружающей среды, вызванных деятельностью человека; природных процессов регуляции микробного населения почвы, воды, воздуха.

- Разработка рекомендаций по оздоровлению объектов окружающей среды и контроль за эффективность проводимых мероприятий. Контроль – предупредительный и текущий санитарный надзор. Предупредительный санитарный надзор необходим при проектировании и строительстве различных предприятий, при выборе источников водоснабжения, работой пищевых пред-приятий, эффективностью обеззараживания сточных вод и т.п.

- Охрана окружающей среды. Эта задача вытекает из всех предыдущих задач санитарной микробиологии, т.к. здоровье человека напрямую зависит от качества окружающей среды.

Основные санитарно-микробиологические методы включают в себя как оригинальные методики, так и методы общей и медицинской микробиологии, которые направлены на определение общей микробной обсемененности (общее микробное число); обнаружение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ); выявление патогенных микроорганизмов и их метаболитов; определение степени доброкачественности изучаемых объектов, обусловленной наличием микроорганизмов.

Для оценки санитарно-эпидемиологического состояния внешней среды в настоящее время используют методы прямого обнаружения патогенных микроорганизмов (посев на питательные среды, гибридизация нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция, серологические, биологические и др. методы), а также методы, позволяющие получить косвенную оценку возможного присутствия возбудителя во внешней среде (определение общего микробного числа и содержание СПМ).

## САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА

Началом развития санитарной микробиологии считают 1888 год, когда французский врач Е. Масе предложил считать кишечную палочку показателем фекального загрязнения воды. Формирование санитарной микробиологии сначала в качестве отрасли гигиены, а затем как самостоятельной науки происходило главным образом в нашей стране.

Начиная с 30-х годов двадцатого столетия, предпринимались попытки собрать разрозненные сведения воедино и создать научную систему в данной области. Развитие отечественной санитарной микробиологии связано с именами Александра Александровича Миллера, Ивана Евгеньевича Минкевича, Вениамина Израилевича Теса, опубликовавших в 1935-1953 годах первые в мире учебники, охватившие все разделы современной микробиологии. Санитарная микробиология в настоящее время представляет собой смежную с эпидемиологией и гигиеной область медицинской микробиологии. Она необходима специалистам разных профилей. В развитие санитарной микробиологии большой вклад вносят ряд специализированных научно-исследовательских институтов: ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, ГУ Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ГУ Центральный НИИ эпидемиологии, ФГУ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» и др.

Значительный вклад в развитие санитарной микробиологии вносит государственная санитарно-эпидемиологическая служба РФ (Роспотребнадзор РФ). Центры государственного санитарно-эпидемиологического надзора различного уровня и существующие при них санитарно-бактериологические лаборатории являются в настоящее время основными практическими учреждениями, осуществляющими государственный санитарный надзор за соблюдением норм и правил, а также за проведением всех необходимых мероприятий по профилактике заболеваний и оздоровлению окружающей среды.

Государственная санитарно-эпидемиологическая служба РФ существует с 15 сентября 1922 года. Именно в этот день был принят Декрет Совета Народных Комиссаров РСФСР «О санитарных органах Республики» - документ, заложивший основу создания в России государственной системы, обеспечивающей охрану здоровья населения страны. С этого времени началось ее становление, формирование целей и задач. Значительный вклад внесли санитарные организации в борьбу с эпидемиями паразитарных тифов, холеры, натуральной оспы, малярии, других опасных инфекционных заболеваний, распространяющихся в стране в начале 20-го века.

В апреле 1991 года был принят Закон РФ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». Впервые в отечественной истории на законодательном уровне введено регулирование общественных отношений в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Впоследствии 30-го марта 1999 года Государственной Думой РФ был принят Федеральный закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

Под санитарно-эпидемиологическом благополучии населения понимают состояние здоровья населения и среды обитания человека, при котором отсутствует вредное воздействие факторов среды на человека и обеспечиваются благоприятные условия его жизнедеятельности.

Основными органами, выполняющими функции по предупреждению, обнаружению и пресечению нарушений санитарного законодательства РФ и обеспечению санитарно-

эпидемиологического благополучия населения, являются органы и учреждения государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ. Они осуществляют государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование, государственный санитарно-эпидемиологический надзор, проведение социально-гигиенического мониторинга и ряд других функций. Основными задачами службы являются: профилактика инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний населения РФ, предупреждение вредного влияния неблагоприятных условий труда, быта, факторов окружающей среды на здоровье человека; гигиеническое воспитание и образование населения.

В настоящее время нормативно-правовой базой обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения являются:

- «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья населения» (1993 г.);

Федеральные законы:

- «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (1991, 1999 г.г.);

- «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)» (1995 г.);

- «Об иммунопрофилактике инфекционных заболеваний» (1998 г.);

- «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (2000 г.);

- «О предупреждении и профилактике туберкулеза в РФ» (2001);

а также:

- «Трудовой кодекс РФ» (2001 г.);

- «Кодекс РФ об административных правонарушениях» (2001 г.);

- ряд других федеральных законов и постановлений Правительства РФ.

В рамках системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования действует более 12 тысяч норм, правил и нормативов. В сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения ведется работа со странами СНГ по взаимопризнанию нормативных и методических документов. В качестве международных действуют более 50 санитарных норм и правил.

## ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На результаты микробиологических анализов оказывают влияние раз-личные факторы. На современном этапе решение задач санитарной микробиологии предопределяется интенсивным загрязнением окружающей среды, кото-рое влияет не только на аутохтонную (нормальную или собственную), но и аллохтонную (санитарно-показательную и патогенную или вносимую извне) микрофлору. При проведении санитарно-микробиологических исследований следует помнить о следующих основных принципах:

- Правильное взятие пробы. Пробы следует отбирать с соблюдением правил стерильности и всех необходимых условий, регламентированных для каждого исследуемого объекта соответствующими нормативными документа-ми: ГОСТ (государственный стандарт), ОСТ (отраслевой стандарт), ГН (гиги-нический норматив), МУК (методические указания), инструкции. Ошибки, до-пущеные при взятии проб, приводят к получению неправильных результатов. При упаковке и транспортировке проб необходимо создавать условия, исклю-чающие гибель или размножение исходной микрофлоры в исследуемых объек-тах. Исследования необходимо проводить быстро; при невозможности немед-ленного проведения анализа материал сохраняют в холодильнике не более 6-8 ч. Каждая проба сопровождается документом, в котором указывается название исследуемого материала, номер пробы, время и место взятия, краткая характе-ристика объекта. На документе должна быть подпись лица, взявшего пробу.

- Осуществление серийных анализов. Распределение микроорганиз-мов в загрязненных объектах неравномерно. Для получения объективных ре-зультатов следует отбирать несколько проб из разных участков. Доставленные в лабораторию пробы смешивают и анализируют среднюю пробу.

- Повторное взятие проб. Многие объекты внешней среды (воздух, вода) динамичны, сменяемость микрофлоры во времени и пространстве велика. Более адекватные результаты можно получить проведением повторных отбо-ров и анализов проб.

- Применение стандартных методов. При проведении анализов сле-дует использовать только стандартные и унифицированные методы исследо-ваний, т.к. стандартизация методов делает результаты исследований легко сравнимыми, достаточно полными и гарантирует от допущения грубых ошибок. Методы исследований для каждого исследуемого объекта регламентиро-ваны соответствующими нормативными документами (ГОСТ, МУК и др.).

- Одновременное использование комплекса тестов. В работе необ-ходимо использовать комплекс тестов – прямых (выявляющих патогены) и кос-венных (указывающих на загрязнение объектов окружающей среды выделени-ями человека и животных). Это позволяет получить разностороннюю санитар-но-микробиологическую характеристику объекта и позволяет выявить отклонения от нормы.

- Оценка объектов по совокупности. Интерпретацию результатов санитарно-микробиологических исследований следует проводить с учетом других гигиенических показателей (органолептических, химических, физиче-ских и др.) на основе установленных нормативов. Это связано с тем, что разви-тие микроорганизмов происходит в тесной взаимосвязи с другими факторами окружающей среды, которые могут оказывать как благоприятное, так и небла-гоприятное влияние на их размножение. При оценке объектов по совокупности показателей необходимо иметь в виду следующее:

1. резкое отклонение микробиологических показателей от нормы даже при благоприятном уровне всех остальных характеристик должно считаться достаточным основанием для неблагоприятной оценки объекта;

2. в ряде случаев благоприятные санитарно-микробиологические показатели не гарантируют безопасности объекта, так как микроорганизмы воздействуют на организм в комплексе с другими факторами.

В силу этих особенностей большинство стандартов включает микро-биологические нормы как один из элементов, характеризующих рассматриваемые объекты. Оценку проводят в соответствии с установленными ГОСТами, ОСТами, ГН, СанПиНами (санитарные правила и нормативы), СП (санитарные правила), специальными техническими регламентами.

## **МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Структуру современной санитарной микробиологии наглядно можно представить в виде двух больших блоков, в каждом из которых изучается определенный круг вопросов: общая и специальная.

Общая санитарная микробиология изучает:

- 1) Микробиологические методы исследования объектов окружающей среды.
- 2) Санитарно-показательные микроорганизмы в окружающей среде.
- 3) Патогенные микроорганизмы в окружающей среде.

Специальная санитарная микробиология изучает направления:

- 1) Санитарная микробиология воды.
- 2) Санитарная микробиология почвы.
- 3) Санитарная микробиология воздуха.
- 4) Санитарная микробиология предметов обихода.
- 5) Санитарная микробиология продуктов питания.

Базовые санитарно-микробиологические методы направлены на определение общей микробной обсемененности (общее микробное число); определение и титрование СПМ; выявление в исследуемых объектах патогенных микроорганизмов и их метаболитов; определение степени недоброкачественности изучаемых объектов или продуктов, вызванной деятельностью микроорганизмов.

Практическая санитарная микробиология использует два основных метода оценки санитарно-эпидемического состояния внешней среды: прямое обнаружение патогенных микроорганизмов и выявление косвенных признаков пребывания патогенов во внешней среде.

### **ОБЩАЯ САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ МЕТОДЫ ПРЯМОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Прямое обнаружение патогенов – наиболее точный показатель неблагополучности исследуемого объекта. Однако выделение патогенных микроорганизмов из объектов окружающей среды затруднено из-за наличия в них большого количества сапротрофов, которые препятствуют росту патогенной микрофлоры на питательных средах. Кроме того, осложняет процесс анализа неравномерное распределение патогенов в окружающей среде и происходящие в условиях внешней среды генетические процессы (мутация, трансформация, трансдукция и др.), которые приводят к изменению исходных и формированию новых признаков патогенных микроорганизмов. В связи с этим исследования на патогенную микрофлору в санитарной микробиологии проводят только по эпидемическим показаниям, а санитарно-показательные исследования имеют целью не обнаружение патогенов, а определение косвенных показателей неблагополучия объектов внешней среды.

Прямой подсчет количества бактерий проводят с помощью специальных камер (Петрова, Гольбера) либо специальных элективных счетчиков. Метод применяют в экстренных случаях при необходимости срочного ответа о количественном содержании бактерий (при авариях в системе водоснабжения, при оценке эффективности работы очистных сооружений и др.).

Методы косвенной идентификации

Эти методы предусматривают применение 2-х критериев, по которым можно косвенно судить о возможном присутствии возбудителя во внешней среде:

- 1) общее микробное число (ОМЧ);
- 2) содержание санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ).

#### Определение общего микробного числа

Под общим микробным числом (ОМЧ) понимают количество колоний, вырастающих на мясопептонном или рыбопептонном агаре (МПА, РПА) в чашках Петри после определенного срока инкубации при той или иной температуре из 1 мл (для твердых субстратов 1 г) исследуемого материала. Таким образом, учитываются мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАнМ), способные расти на МПА. Выражается в кл/мл, кл/г, кл/м3 или КОЕ/мл, КОЕ/г, КОЕ/м3. Предполагается, что чем больше объект загрязнен органическими веществами, тем выше ОМЧ. Определение ОМЧ широко используется для санитарной оценки воды и почвы, хотя при этом значительное количество почвенных и водных микроорганизмов не учитывается (выпадают из учета анаэробы, грибы, серные, азотфиксированные, нитрифицирующие и другие бактерии). При необходимости для учета этих микроорганизмов используют соответствующие питательные среды (чашечный метод Коха).

Недостаток метода – неточность, т.к. получаемые данные численности ниже истинного количества микроорганизмов в исследуемом объекте, что связано со следующими причинами:

- невозможно подобрать универсальную среду, на которой могут вырасти все группы микроорганизмов, т.к. потребности микроорганизмов в питательных веществах различны;
- микроорганизмы, находящиеся в крупных агрегатах исследуемого объекта, не дают роста;
- возможен рост колоний на чашках Петри не из одной клетки;
- режим инкубации не соответствует требованиям всех микроорганизмов исследуемого субстрата;
- некоторые микроорганизмы теряют способность к размножению в силу антагонизма, конкуренции и других факторов.

Общее количество микроорганизмов можно определить путем прямого подсчета под микроскопом, используя:

- специальные счетные камеры (для крупных объектов – дрожжей, конидий грибов, некоторых относительно крупных бактерий);
- препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах (для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах);
- окрашенные мембранные фильтры, через которую пропускают исследуемую жидкость или взвесь (рекомендуется использовать для оценки численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток).

Метод применяется в экстренных случаях, когда необходимо срочно дать ответ о количественном содержании бактерий, например при авариях в системе водоснабжения и т.п. Метод является простым и удобным, но имеет следующие недостатки:

- микроорганизмы часто образуют скопления или адсорбируются на частицах исследуемого субстрата, что не дает возможности точного определения общего количества микроорганизмов;
- мелкие клетки микроорганизмов достаточно трудно поддаются учету;
- подсчитывается суммарное количество живых и мертвых клеток микроорганизмов, хотя они имеют разное санитарное значение;

- критерий применим не для всех объектов (пример – кисломолочные продукты, приготовленные путем внесения специальных заквасочных культур микроорганизмов).

При определении ОМЧ методом посева выявляют лишь мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, способных размножаться на данных средах.

Таким образом, оба метода являются приблизительными. Для получения сравнимых результатов определение ОМЧ проводят по стандартным методикам, регламентированным для каждого объекта соответствующими нормативными документами.

#### Санитарно-показательные микроорганизмы

К санитарно-показательным микроорганизмам (СПМ) относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, обитающих в кишечнике или воздушно-дыхательных путях. В качестве СПМ могут выступать не все представители нормальной микрофлоры человека и животных, а лишь те, которые удовлетворяют следующим требованиям (Коротяев, Бабичев, 1998; Байчурина и др., 1998; Поздеев, 2001):

- постоянно присутствуют в выделениях человека и теплокровных животных и попадают в окружающую среду в больших количествах;
- не имеют иного природного резервуара, кроме организма человека или животного;
- не размножаются активно во внешней среде (исключая пищевые продукты);
- выживают во внешней среде несколько больше, чем патогенные микроорганизмы;
- не имеют во внешней среде «двойников» или аналогов, поэтому исключена путаница;
- не изменяют сколько-нибудь значительно свои биологические свойства в окружающей среде;
- растут на питательных средах независимо от влияния других присутствующих микроорганизмов;
- распределены в объекте внешней среды по возможности равномерно (плотные объекты при исследовании подвергаются гомогенизации);
- могут быть обнаружены, идентифицированы и количественно учтены современными, простыми и легко доступными методами;
- встречаются в организме хозяина и во внешней среде в значительно больших количествах по сравнению с соответствующими патогенными микроорганизмами.

Предполагается, что чем больше объект загрязнен экскрементами человека и животных, тем больше будет СПМ и тем вероятнее присутствие патогенов.

СПМ выявляют методом посева на определенные питательные среды. Содержание СПМ оценивают двумя показателями – титру и индексу. Титром называется выраженное в миллилитрах (для твердых тел – 1 г) наименьшее количество исследуемого материала, в котором обнаруживаются данные бактерии. Индексом называется количество СПМ, обнаруженных в 1 л (1 г плотных веществ, 1 м<sup>3</sup> воздуха). Индекс – величина, обратная титру.

#### Группы санитарно-показательных микроорганизмов

Все микроорганизмы, относящиеся к категории санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ), можно разделить на 3 группы:

1 группа. Показатели фекального загрязнения – представители нормальной микрофлоры кишечника, поэтому они указывают на фекальное загрязнение объектов

окружающей среды и свидетельствуют о возможном присутствии в этих объектах возбудителей кишечных инфекций и токсицинфекций:

- БГКП (бактерии группы кишечной палочки), ОКБ (общие колиформные бактерии), ТКБ (термотолерантные колиформные бактерии);

- энтерококки;
- сульфитредуцирующие клостридии;
- бактерии группы протеев (*Proteus mirabilis*).

2 группа. Показатели воздушно-капельного загрязнения – представители нормальной микрофлоры верхних отделов дыхательных путей, они являются показателями биологической контаминации (загрязнения) воздуха и других объектов окружающей среды обитателями респираторного тракта человека и теплокровных животных:

- стафилококки;
- зеленящие ( $\alpha$ -стрептококки);
- гемолитические ( $\beta$ -стрептококки).

3 группа. Показатели загрязнения объектов внешней среды разлагающими органическими субстратами:

- бактерии группы протеев (*Proteus vulgaris*), термофильные и нитрифицирующие бактерии.

Между группами СПМ нет четко очерченных границ. Некоторые микрорганизмы являются показателями как фекального, так и орального загрязнения. Некоторые – показателями самоочищения. В связи с этим СПМ расценивают как индикаторы биологического загрязнения.

Таким образом, к СПМ относятся представители разных систематических групп бактерий (табл. 1).

Таблица 1. Санитарно-показательные микроорганизмы окружающей среды и пищевых продуктов (Борисов, 1993).

Объект	Характер загрязнения	Санитарно-показательные микроорганизмы
Вода	Фекальное	Бактерии группы кишечных палочек <i>E.coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>
Почва	Фекальное	Те же бактерии и клостридии ( <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Cl. sporogenes</i> и др.)
	Промышленно-бытовое (разлагающиеся отбросы)	Термофильные бактерии ( <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> и др.), <i>Proteus vulgaris</i>
Пищевые продукты	Фекальное	Бактерии группы кишечных палочек, <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
	Орально-капельное	<i>Staphylococcus aureus</i>
Воздух	Орально-капельное	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>
Вода, почва, воздух	Промышленное	Производственные штаммы микроорганизмов

Наиболее важными СПМ считаются бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Под этим общим понятием объединяют бактерии семейства Enterobacteriaceae родов

*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. К катего-рии БГКП относят грамотрицательные, не образующие спор и не обладающие оксидазной активностью палочки, сбраживающие лактозу до кислоты и газа при 370С в течение 24 - 48 ч или сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа при 370С в течение 24 ч. Среди БГКП выделяют лактозоположи-тельные палочки (ЛКП), которые в соответствии с международной номенклатурой относят к колиформным бактериям.

Общие колиформные бактерии (ОКБ) – грамотрицательные, оксидазо-отрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при 370С в течение 24–48 ч.

Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число ОКБ, обладают всеми их признаками и способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при 44-44,50С в течение 24 ч. Из фекальных кишечных палочек к *E.coli* относятся только бактерии, не способные расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии цитрат. Эти бактерии являются показателями свежего фекального загрязнения.

Для обнаружения БГКП сначала делают посев исследуемого материала на дифференциально-диагностическую среду Эндо (в качестве источника углерода она содержит лактозу). В соответствие с требованиями ГОСТ все бактерии, дающие рост на среде Эндо при температуре 37±0,50С в течение 24 ч, получили название энтеробактерии.

Бактерии рода *Enterococcus* также являются постоянными обитателями кишечника человека. Энтерококки отмирают во внешней среде значительно раньше, чем *E.coli*. Поэтому они всегда свидетельствуют о свежем фекальном загрязнении.

Большое санитарное значение имеют представители родов *Proteus*. Присутствие в анализируемых пробах *Proteus vulgaris* свидетельствует о за-грязнении объекта органическими веществами (чаще обнаруживают в гнию-щих остатках; сточных водах пищевой промышленности, богатых органиче-скими веществами), а *P. mirabilis* – о фекальном загрязнении (чаще обнаруживают в фекалиях, хозяйственно-бытовых сточных водах). Обнаружение проте-ев в пищевых продуктах свидетельствует о гнилостном распаде. Таким образом, *P. mirabilis* – дополнительный показатель фекального загрязнения, а *P. vulgaris* – показатель загрязнения разлагающимися пищевыми органическими субстратами.

Анализ на присутствие микроорганизмов этой группы проводят в сле-дующих случаях:

- при санитарно-микробиологическом исследовании пищевых продуктов для выявления их порчи;
- для оценки санитарного состояния водоемов в местах сброса сточных вод пищевой промышленности;
- для оценки санитарного состояния почв при загрязнении их органиче-скими отходами;
- при санитарно-микробиологическом исследовании предметов обихода (особенно столовых приборов).

Сульфитредуцирующие клоstrидии, также как энтерококки и кишечные палочки, являются обитателями кишечника человека и некоторых тепло-кровных животных и выделяются в окружающую среду в количестве от 100 до 109 кл/г фекалий.

Санитарно-показательное значение имеют *Clostridium perfringens* и *C. sporogenes*. Они способны редуцировать (восстанавливать) сульфит при росте в сульфитных средах, поэтому и получили название – сульфитредуцирующие. В соответствие с МУК 4.2.1018-01

«Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» к сульфитвосстанавливающим клостридиям относят споро-образующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре при температуре  $44\pm0,50\text{C}$  в течение 16-18 ч.

Обнаружение *Clostridium perfringens* свидетельствует о некогда имевшем место фекальном загрязнении (эти бактерии образуют споры, что позволяет им длительно сохраняться в окружающей среде). В отечественной практике количественный учет клостридий предусмотрен при исследованиях почвы, лечебных грязей, воды открытых водоемов. Определение этого микроорганизма проводят в некоторых пищевых продуктах, но уже как возбудителя пищевых отравлений.

Термофильные микроорганизмы, имеющие санитарное значение, представлены преимущественно спорообразующими бактериями, способными размножаться при  $50\text{-}600\text{C}$ . Их выделяют из объектов окружающей среды (загрязненных компостом или навозом, реже из кишечника человека или животных). В отечественной практике этот показатель применяют при исследовании почвы. Резкое увеличение количества этих бактерий в почве свидетельствует о загрязнении разлагающимися отбросами. Анализ на содержание термофилов проводят также при исследовании консервов для индикации эффективности автоклавирования.

Обнаружение в объектах окружающей среды бактерий рода *Salmonella* всегда свидетельствует о фекальном загрязнении. Эти микроорганизмы являются наиболее распространенными возбудителями острых кишечных заболеваний и поэтому являются индикаторами возможного присутствия других возбудителей инфекций с аналогичным патогенезом и эпидемиологией.

К роду *Salmonella* семейства Enterobacteriaceae относятся возбудители брюшного тифа (*S. typhi*), паратифов, А и В (*S. paratyphi* А и В), сальмонеллезов или пищевых токсицинфекций (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*). Сальмонеллы содержат эндотоксин, который играет большую роль в патогенезе заболеваний, способствуя быстрому проникновению возбудителей из кишечника в лимфатическую систему и кровь, вызывая интоксикацию организма.

*Staphylococcus aureus* – факультативный обитатель носоглотки, зева и кожных покровов человека. Присутствие этих микроорганизмов в воздухе помещений или на находящихся там предметах указывает на орально-капельное загрязнение. Наличие *Staphylococcus aureus* в пищевых продуктах может привести к тяжелым пищевым интоксикациям.

Гемолитические стрептококки, являясь транзитными обитателями носоглотки и зева, выделяются с капельками слизи орально-капельным путем. Сроки их выживания во внешней среде аналогичны таковым для большинства других возбудителей воздушно-капельных инфекций. Обнаружение этих бактерий в воздухе помещений свидетельствует о возможном загрязнении патогенами.

Таблица 2. Соотношение различных групп санитарно-показательных микроорганизмов в зависимости от давности загрязнения (Калина, Чистович, 1969).

Вид загрязнения	Санитарно-показательные микроорганизмы			
	БГКП (ОКБ), ТКБ	энтерококки	термофилы	нитрификаторы
Фекальное свежее	+++(ТКБ)	+++	±	±
Фекальное	++ (БГКП, ОКБ)			

относитель но давнее		±	±	++
Фекальное давнее	±	±	±	++
Разлагающ иеся органическ ие субстраты, свежее	+++ (БГКП, ОКБ)	+	+ (+)	+
Разлагающ иеся органическ ие субстраты, давнее	±	±	++ (+)	++

Примечание. +++ очень много; ++ много; + мало; ± очень мало или отсутствует.

Санитарно-показательное значение имеют также бактериофаги кишечных палочек (колифаги). Они сопутствуют тем бактериям, к которым адаптированы. В то же время, бактериофаги могут длительно сохраняться и переживать соответствующих бактерий. Бактериофаги кишечных бактерий можно использовать для гигиенической оценки внешней среды.

Следует учитывать, что определение лишь одной группы СПМ может привести к серьезным ошибкам при оценке качества объектов окружающей среды. Это связано с тем, что в различных объектах окружающей среды могут создаваться условия, при которых одни СПМ либо быстро погибают, либо получают возможность интенсивно размножаться. Для получения наиболее полной санитарно-микробиологической характеристики объекта, проводят комплексное определение загрязнения на основании поиска нескольких различных групп СПМ (табл. 3).

Таблица 3. Группы санитарно-показательных микроорганизмов при оценке различных объектов окружающей среды.

Объект	Группы санитарно-показательных микроорганизмов							
	1		2		3			
	БГКП (ОКБ, ТКБ)	энтерококки	сульфредуцирующие клостридии	стафилококки	стрептококки	бактерии группы протея	термофилы	нитрифицирующие
Вода	+	(+)	+	+		+		+
Почва	+		+			+	+	+
Воздух				+	+			
Пищевые продукты	+		+	+		+		
Предметы обихода	+			+	+	+		

Выбор того или ионного СПМ в пределах одной группы определяется задачами исследований. При этом, в зависимости от поставленной задачи, можно определять:

- массивность того или иного загрязнения (количественный учет СПМ);
- давность загрязнения (по количественному соотношению различных групп СПМ, табл. 2);

- характер загрязнения (в зависимости от обнаруженных групп СПМ, табл. 1).

Кроме того, на результаты санитарно-микробиологических анализов могут повлиять различные факторы, поэтому при проведении таких исследований необходимо соблюдать следующие принципы: правильный отбор проб; серийность проводимых анализов; применение только стандартных и унифицированных методов исследования; использование комплекса тестов (прямых и косвенных); проведение оценки объектов по совокупности полученных результатов (с учетом результатов, полученных с помощью органолептических, химических, физических и других методов).

## ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

В зависимости от взаимоотношений с хозяином микроорганизмы делят на:

- непатогенные, т.е. практически безвредные;
- условно-патогенные (оппортунисты, от англ. opportunity – удобный, подходящий случай, возможность) – реализация их патогенности зависит от определенных условий. Почти все микробы-оппортунисты постоянно или временно входят в состав нормальной микробиоты человека и, следовательно, создают прецедент для различного рода инфекций (эндо- или аутогенных);
- патогенные – облигатно болезнетворные.

В соответствии с Санитарными правилами СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности» все патогенные микроорганизмы разделены на 4 группы в зависимости от степени опасности для людей:

І группа. Возбудитель чумы.

ІІ группа. Возбудители холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, лептоспироза, сапа; грибковых заболеваний – гистоплазмоза; биологические яды – ботулиновый токсин типов А, В, Е, F.

ІІІ группа. Возбудители кишечных инфекций – брюшного тифа, дизентерии; возбудители туберкулеза, дифтерии; грибковых заболеваний – актино-микоза, дерматомикозов.

ІV группа. Возбудители токсикоинфекций и острых бактериальных отравлений (сальмонеллы, стафилококки, клостридии и др.), энтеритов - эшерихии и др.

При санитарно-микробиологическом исследовании объектов окружающей среды чаще всего определяют микроорганизмы ІІІ- ІV групп. Для работы с возбудителями І и ІІ групп требуется специальное разрешение Главного санитарного врача РФ и главных государственных врачей по субъектам РФ.

Таблица 4. Особо опасные бактериальные токсины (Современная микробиология, 2005).

Токсин	Продуцирующий организм	Заболевание	Характер действия	Локализация гена
Токсин токсического шока	<i>Staphylococcus aureus</i>	Раневые и кожные инфекции	Суперантigen	Бактериофаг
Эритрогененный токсин А	<i>Staphylococcus pyogenes</i>	Септицемия	Суперантigen	Бактериофаг
α-Гемолизин	<i>Escherichia coli</i>	Инфекции мочевыводящих путей	Образование пор	Хромосома/плазмида
α-Токсин	<i>Staphylococcus aureus</i>	Раневые и кожные инфекции	Образование пор	Хромосома
О-стрептолизин	<i>Staphylococcus pyogenes</i>	Скарлатина, фарингит	Образование пор	Хромосома
Пневмолизин	<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	Пневмония	Образование пор	Хромосома
Лецитинза	<i>Clostridium perfringens</i>	Газовая гангрена	Фосфолипаза	Хромосома
Фосфолипаза G	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Кожные инфекции, инфекции дыхательных	Фосфолипаза	Хромосома

		путь		
Экзотосин А	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Кожные инфекции, инфекции дыхательных путей	ADP-рибозилирование	Хромосома
Дифтерийный токсин	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Дифтерия	ADP-рибозилирование	Бактериофаг
Холерный токсин	<i>Vibrio cholerae</i>	Холера	ADP-рибозилирование	Бактериофаг
LT-энтеротоксин	<i>Escherichia coli</i>	Гастроэнтерит	ADP-рибозилирование	Плазмида/хромосома
Коклюшный токсин	<i>Bordetella pertussis</i>	Коклюш	ADP-рибозилирование	Хромосома
Шиготоксин	<i>Shigella dysenteriae</i>	Дизентерия	28S-РНКаза	Хромосома
Шигоподобный токсин	<i>Escherichia coli</i>	Гастроэнтерит	28S-РНКаза	Бактериофаг
Столбнячный токсин	<i>Clostridium tetani</i>	Столбняк	Протеаза	Плазмида
Токсин ботулизма	<i>Clostridium botulinum</i>	Ботулизм	Протеаза	Бактериофаг

### Характеристика некоторых патогенных микроорганизмов

#### Грамположительные кокки

Грамположительные кокки представлены стафилококками и стрепто-кокками.

Отличительные особенности стафилококков и стрептококков:

- отсутствие способности к спорообразованию,
- сферическая форма,
- положительная окраска по Граму.

#### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* – грамположительные, факультативные анаэро-бы, диапазон роста и токсинообразования от 6 до 450С, оптимум – 30-370С. Интенсивно размножается при комнатной температуре (18-200С). Образуют пигмент – липохром золотистого цвета. Устойчивы к высушиванию, замораживанию, действию солнечного света и химических веществ.

**Распространение.** Золотистый стафилококк распространен повсеместно и часто входит в состав нормальной микрофлоры макрорганизма (носите-ли). Микроорганизм выделяют у 15-30 % клинически здоровых взрослых людей. В большинстве случаев носительство ограничено несколькими неделями или месяцами; хроническое носительство типично для персонала медицинских учреждений; пациентов, страдающих атопическими дерматитами, а также регулярно использующих инъекции различных препаратов. Могут развиваться в пищевых продуктах при концентрации соли 10-15 % и высоком содержании сахара – до 50 %. Прогревание при 700С выдерживают в течение 1 часа, при 800С погибают через 20-40 мин. Не растут при рН ниже 4,2-4,5.

Наиболее частой причиной пищевых интоксикаций считается энтеро-токсин А, весьма устойчивый к нагреванию. Для его полного разрушения необходимо кипячение около 2 ч или 30-минутное прогревание при 120°С. Основным источником заражения пищевых продуктов энтеротоксигенными стафилококками служат люди, страдающие гнойничковыми заболеваниями кожи, или носители. Распространение возбудителя происходит воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактным путями. Иногда

энтеротоксигенный стафилококк попадает в пищу от больных животных, например в молоко - от коров, страдающих стафилококковым воспалением вымени (маститом). При комнатной температуре токсины накапливаются в молоке, салатах уже через 6-10 ч, а при 35-37°C - через 2-5 ч.

Причиной отравления могут послужить различные продукты (мясные, рыбные, кулинарные изделия, кондитерские, особенно с заварным кремом, сметана, творог и др.). Пищевые продукты, пораженные стафилококками, обычно не имеют внешних признаков порчи. Инкубационный период от 30 мин до 6 ч. Типичные симптомы: рвота, боли в области живота, сердечная слабость. Профилактика отравлений: отстранение от работы с пищевыми продуктами людей с гнойничковыми поражениями кожи, заболеваниями носоглотки и верхних дыхательных путей, создание условий, исключающих размножение стафилококков и накопление образуемых ими токсинов.

#### Микробиологическая диагностика

**Микроскопия.** Выявление скоплений грамположительных кокков (рис. 1) при исследовании окрашенных мазков исследуемого материала может служить основанием для предварительной идентификации. Результаты микроскопии нельзя считать достаточными для окончательного заключения.

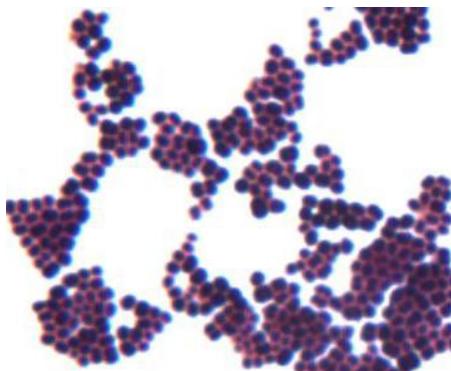


Рисунок. 1. Морфология клеток *Staphylococcus aureus*.

**Выделение возбудителя.** Посев проводят на простые питательные среды (рис. 2), обычно на тиогликолевую среду или КА. Если существует риск контаминации образца, применяют дифференциално-диагностические среды. Наиболее часто используют молочно-солевой (МСА) или молочно-желточно-солевой агар (МЖСА) и солевой агар с маннитом, на них рост контаминирующей микрофлоры угнетает высокая концентрация NaCl. Кроме того, на МСА хорошо проявляется способность к пигментообразованию и разложению леци-тина (лецитовителазная активность).

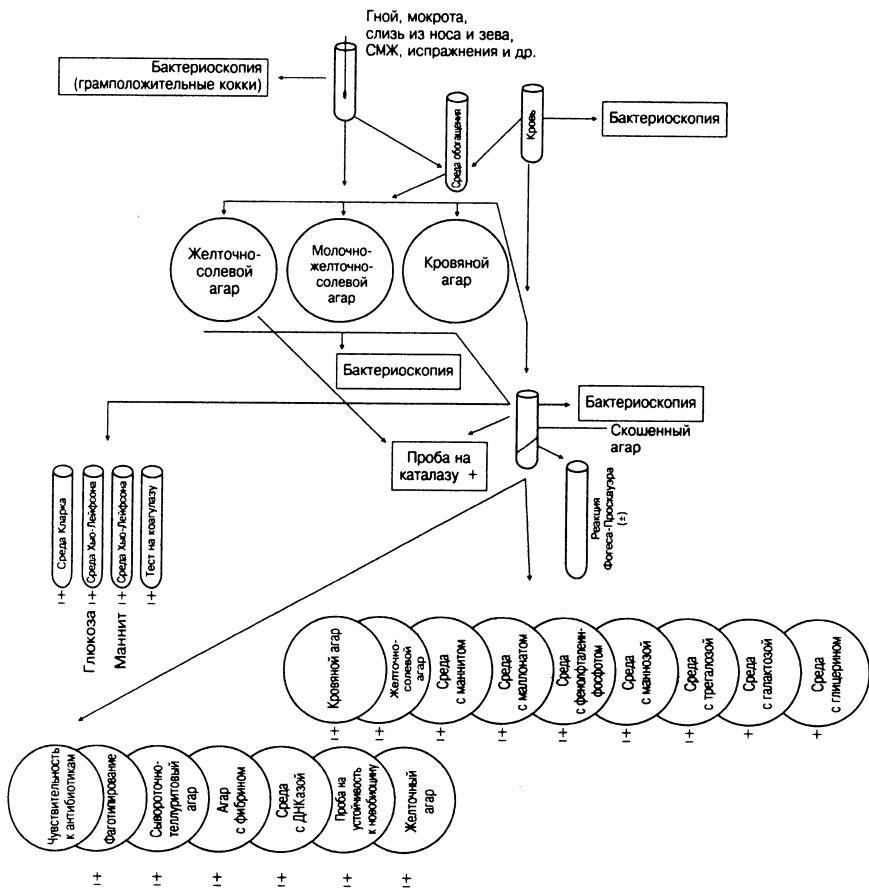


Рисунок 2. Принципиальная схема выделения стафилококков.

Рост. Через 24 ч. *S. aureus* образует гладкие выпуклые мутные колонии обычно желтоватого цвета около 4 мм в диаметре (бактерии вырабатывают желтый пигмент, и цвет колонии варьирует от белого до оранжевого); наиболее интенсивно пигмент образуется на агаре, дополненном 10 % снятого молока. На кровяном агаре они окружены зоной полного гемолиза.

Иногда, особенно на бедных средах, лишенных необходимых ростовых факторов (гемин, тиамин, пантотенат и др.), может формировать карликовые G-колонии (менее 1% изолятов), лишенные зон гемолиза и часто растущие в виде сателлитных колоний вокруг других бактерий в смешанных культурах.

Дифференцировка. Применяют коагулазный тест на наличие свертывающего фактора, положительный для 95 % изолятов (желательно исследовать наличие свободного и связанного с клетками фермента), а также определяют способность ферментировать маннит (разлагают); исследуют способность синтезировать термостабильную ДНКазу и агглютинировать частицы латекса или сенсибилизованные эритроциты барана. Последний тест позволяет выявлять белок A и свертывающий фактор либо оба продукта. Следует помнить о возможных ложноположительных результатах при наличии *S. epidermidis* и микрококков, а также ложноотрицательных, обычных для метициллина (окса-циллина) резистентных штаммов *S. aureus* (MRSA). В редких случаях инфекций, вызванных *S. intermedius* (обычно после укусов собак), также выделяют коагулаза-положительные стафилококки, отличающиеся от *S. aureus* способностью синтезировать пироглютамил- $\square$ -афтиламидаминопептидазу.

Микроорганизмы рода *Streptococcus*

Микроорганизмы указанного рода, по данным определителя бактерий Берджи, обладают не ясным до конца систематическим положением. В частно-сти, в данный род в настоящее время объединены энтерококки, молочнокислые стрептококки, стрептококки ротовой полости, пиогенные и анаэробные стреп-тококки.

Стрептококки впервые обнаружены в тканях человека при рожистом воспалении и раневых инфекциях (Бильрот, 1874), септициемиях и гнойных по-ражениях (Пастер, 1879, Огстон, 1881); в чистой культуре их выделили Феляй-зен (1883) и Розенбах (1884). Род образуют сферические или оvoidные микро-организмы, размером 0,5-2,0 мкм, в мазках располагаются парами или короткими цепочками (особенно при выращивании на жидких средах) под различными воздействиями могут приобретать вытянутую или ланцетовидную форму, напоминая коккобациллы. Неподвижны, спор не образуют; некоторые виды имеют капсулу. Хемоорганотрофы, метаболизм бродильный, виды, играющие роль в патологическом процессе, ферментируют глюкозу с образованием молочной кислоты. Каталазоотрицательны; большинство видов проявляет гемолитическую активность. Факультативные анаэробы; предпочтительно содержание 5 % СО<sub>2</sub>; некоторые – микроаэрофилы, предпочитают анаэробные условия. Растут в интервале 25-45°C, температурный оптимум роста 37°C.

#### Стрептококки группы А

Большинство изолятов принадлежит к виду *S. pyogenes*. Микроорганизмы известны с глубокой древности, но своего пика заболеваемость достигла в XIX в. На этот период приходятся известные эпидемии скарлатины, многочисленные случаи фарингитов, нередко заканчивавшихся пневмониями, ревматизмом. Также широко распространились инфекции кожи и мягких тканей – иногда до рожи, часто заканчивающейся фатально. Последняя была неизбежным спутником войн. Стрептококковые поражения дают подъем заболеваемости и в настоящее время даже во вполне благополучных странах (эпидемическая вспышка в Солт-Лейк Сити штата Юта, США в 1985 г). Зарегистрированы относительно новые формы поражений, например стрептококковый токсический синдром, напоминающий аналогичное поражение, вызываемое стафилококками.

**Распространение.** Стрептококки группы А – убиквитарные (встречающиеся повсеместно) микроорганизмы, часто колонизирующие кожные покровы и слизистые оболочки, в частности, в холодный сезон частота носительства в носоглотке у школьников может достигать 25 %. Резервуар – больной или носитель, основные пути передачи – контактный (с заносом в рот грязными руками) и воздушно-капельный, а также через инфицированные пищевые продукты, хранящиеся при комнатной температуре (например, молоко).

**Лабораторная диагностика.** Наиболее доступным способом считают выделение возбудителя (рис. 3), т.к. прочие методы диагностики имеют различные ограничения. Основу микробиологической диагностики составляют выделение и идентификация возбудителя. При этом обычно биохимические характеристики изолятов не изучают. Прочие методы диагностики имеют различные ограничения.

Через 24 ч. на кровяном агаре стрептококки группы А образуют колонии 3 типов: крупные, блестящие, вязкие, напоминающие каплю воды (характерны для свежевыделенных вирулентных изолятов, имеющих капсулу; наиболее часто образует *S. pyogenes*); серые, матовые, зернистые, с неровным краем; выпуклые прозрачные колонии диаметром около 0,1-0,3 мм (характерны для авирулентных лабораторных штаммов). Колонии окружены зоной полного гемолиза (размеры в 2-4 раза превышают диаметр колонии). На жидких средах дают

придонный иногда поднимающийся вверх рост. В мазках выявляют ти-личные грамположительные кокки, образующие короткие цепочки, также мож-но обнаружить полиморфные формы, напоминающие коринебактерии или лак-тобациллы, либо грамотрицательные формы (из старых культур или от лиц, получавших антибиотики), также следует помнить о способности стрептокок-ков образовывать L- формы.

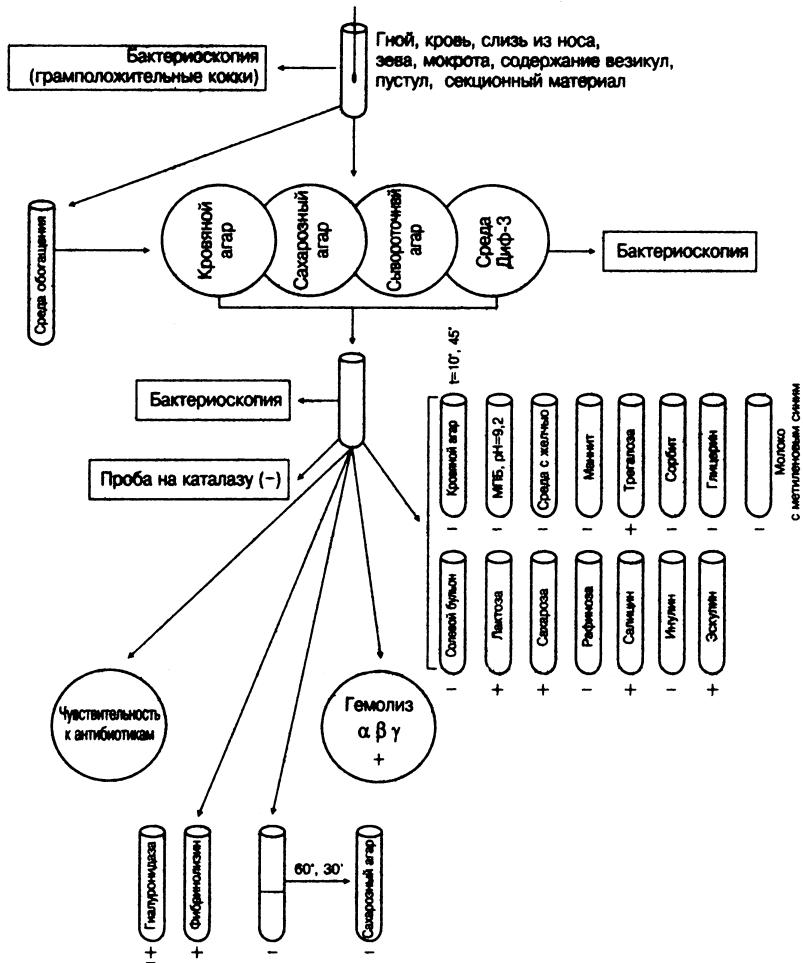


Рисунок 3. Принципиальная схема бактериологического выделения стрептококков группы А.

Для дифференцировки выделенные микроорганизмы засевают на тио-гликоловую среду, полужидкий агар, выросшие стрептококки отличаются ти-личной морфологией.

Также можно произвести посев на кровяной агар и нанести на его по-верхность диск, пропитанный пенициллином (10 ЕД), через 24 ч исследуют мазки из колоний, стрептококки принимают сферическую форму (рис. 4), а лак-тобациллы сохраняют вытянутую форму. Стрептококки группы А также мож-но легко выявить в мазках из зева, используя стандартные наборы.

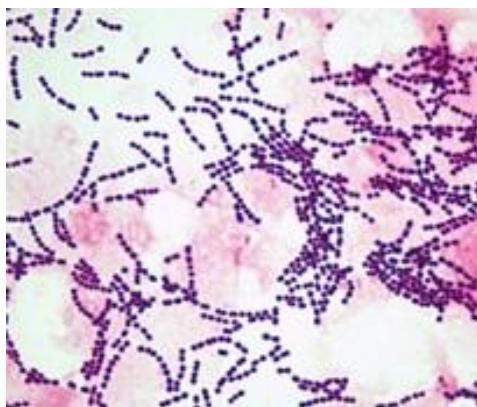


Рисунок 4. Морфология клеток рода *Streptococcus*.

#### Стрептококки группы В

Колонизируют носоглотку, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ); значительная часть изолятов идентифицирована как *S. agalactiae*. Его основным reservoirом считают ЖКТ.

Особо необходимо отметить стрептококковые пневмонии, развивающиеся на фоне респираторных вирусных инфекций; «чистые» бактериальные поражения наблюдают редко, но как осложнения ОРВИ пневмонии отмечают так часто, что создается впечатление, что сами стрептококки группы В не способны вызывать поражения легких. В подавляющем большинстве эти инфекции обусловлены активацией микрофлоры в зеве и носоглотке, реже регистрируют заражение от больного вирусами в ассоциации с высоковирулентными стрептококками. Несмотря на то, что подобные пневмонии вызывают различные виды микроорганизмов, имеются данные, свидетельствующие о прямой связи между вирусами и стрептококками группы В; так, летальный синергизм с вирусом гриппа известен еще с 30-х гг. Массовое заражение респираторными вирусами увеличивает чувствительность легочной ткани к бактериальным суперинфекциям уже через несколько часов после проникновения первичного инфекционного агента.

Лабораторная диагностика. Принципы бактериологической идентификации аналогичны подходам к выделению стрептококков группы А (рис 3).

Колонии, выросшие на кровяном агаре, через 24 ч прозрачные или мутноватые, выпуклые, диаметром 0,5-1,0 мм, окружены зоной гемолиза; 5-15 % изолятов может не проявлять гемолитических свойств. При выделении атипичных форм прибегают к посеву на тиогликоловую среду, полужидкий агар, агар с глюкозой либо проводят пересев на кровяной агар и используют диски с пенициллином (аналогично манипуляциям с атипичными формами стрептококков группы А).

Стрептококки группы В обычно нечувствительны к бацитрацину, разлагают гиалуронат. Дальнейшую идентификацию проводят серотипированием в реакции латекс-агглютинации или коагглютинации с коммерческими реагентами либо с помощью инкубации мазков с моноклональными АТ, меченными флюоресцеинами.

#### *S. pneumoniae* (пневмококк)

Серологически неоднороден, капсульных полисахаридов выделяют 84 серовара, известны штаммы, колонизирующие организмы человека и животных. Впервые *S. pneumoniae* выделил Л. Пастер (1881) во время работы над антирабической вакциной; этиологическую роль в развитии пневмонии у человека доказали Френкель и Вайхзельбаум (1884).

Распространение. Пневмококк - один из основных возбудителей бактериальных пневмоний, регистрируемых вне стационаров (2-4 случая на 1000 человек), ежегодно в мире

наблюдают не менее 500 000 случаев пневмококко-вых пневмоний людей (реальная величина значительно больше). Наиболее подвержены инфекции дети и лица преклонного возраста. Резервуар инфекции - больные и носители (20-50 % детей дошкольного возраста и 20-25 % взрос-лых лиц), основной путь передачи - контактный, в период вспышек также воздушно-капельный. Пик заболеваемости приходится на холодное время года. В подавляющем большинстве случаев клинические формы инфекции развиваются при нарушениях резистентности организма.

Морфология и культуральные свойства. Овальные или ланцетовид-ные кокки диаметром около 1 мкм в мазках из исследуемого материала располагаются парами, каждая из которых окружена толстой капсулой, на пита-тельных средах могут располагаться цепочками и быть более округлыми. На простых средах образуют тонкую капсулу, ее развитие стимулирует внесение крови, сыворотки. Неподвижны, спор не образуют; аэробы или факультатив-ные анаэробы, при культивировании предпочтительны капнофильные условия (5-10 % СО<sub>2</sub>).

Хорошо растут на кровяных или сывороточных средах, дополненных 0,1% глюкозой, температурный оптимум - 37°C; оптимум pH 7,8. На жидких средах дают равномерное помутнение и небольшой хлопьевидный осадок, при длительном культивировании осадок увеличивается. На агаре образуют нежные полупрозрачные четко очерченные колонии диаметром около 1 мм, иногда они могут быть плоскими с центральным углублением, подобно прочим стрептококкам, колонии никогда не сливаются между собой. На кровяном ага-ре колонии окружает зона β-гемолиза в виде зеленоватой обесцвеченной зоны.

Лабораторная диагностика Схема выделения возбудителя представлена на рисунке 5. Следует помнить, что пробы необходимо исследовать быстро, т. к. бактерии склонны к быстрому аутолизу, обусловленному актив-ностью внутриклеточных ферментов. На пневмококковую инфекцию указывает наличие нейтрофилов и грамположительных ланцетовидных диплококков (не менее 10 в поле зрения) в мазках исследуемого материала. В противном случае прибегают к выделению возбудителя.

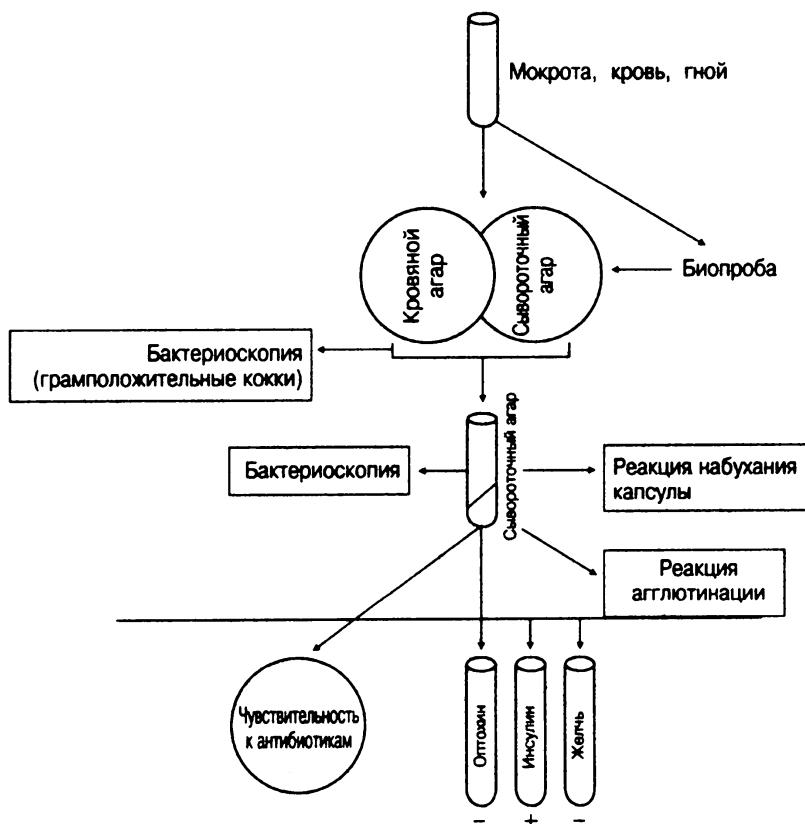


Рисунок 5. Принципиальная схема бактериологического выделения пневмококков.

1. Для дифференцировки от прочих стрептококков используется проба с оптохином (угнетает их рост); от зеленящих стрептококков возбудитель отличают способность ферментировать инулин, а также чувствительность к желчи (дезоксихолатная проба).

2. Изоляты, выделенные из полостей (например, при менингите), следует серотипировать, используя коммерческие реагенты для реакции латекс-агглютинации или коагглютинации, выявляющих капсульные Аг.

3. При сомнительных результатах можно внутрибрюшинно заразить белых мышей материалом от больного, а затем провести бактериологические и серологические исследования перitoneального экссудата.

#### Негемолитические стрептококки

Составляют гетерогенную группу бактерий, дающих неполный ( $\square$ ) гемолиз (исключая некоторые изоляты *S. anginosus*). Поскольку они вызывают позеленение кровяных сред, их также обозначают как зеленящие стрептококки. Зеленящие стрептококки входят в состав микрофлоры ротовой полости (составляют 30-60 %) и кишечника, но также способны вызывать инфекционные поражения при проникновении в обычно стерильные полости.

**Лабораторная диагностика.** Помимо общих лабораторных исследований, включает выделение возбудителя по стандартной схеме. На наличие возбудителей указывает появление  $\square$ -гемолизирующих или негемолизирующих колоний, *S. anginosus* образует мелкие ( $>0,5$  мм) колонии, окруженные зоной  $\square$ - или  $\square$ -гемолиза. Дальнейшую дифференцировку проводят по отсутствию способности расти на жидкых средах с 6,5 % NaCl (в отличие от энтерококков), неспособности гидролизовать эскултин в присутствии солей желчных кислот (могут быть положительны 10% изолятов). Следует с осторожностью

применять коммерческие наборы для видовой идентификации, т.к. таксономия зеленящих стрептококков нуждается в доработке и постоянно совершенствуется.

#### Прочие стрептококки

Стрептококки групп С и G являются представителями микробных сообществ верхних отделов дыхательных путей и ЖКТ многих млекопитающих и спорадически колонизируют кожные покровы, зев, кишечник. Систематика микроорганизмов нуждается в более детальной проработке. У человека наиболее часто выделяют *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae*, *S. zooepidermicus*, *S. equi* и недифференцированные виды, образующие крупные колонии; к этой группе также относятся некоторые изоляты *S. anginosus*, не проявляющие миcroаэрофильных или анаэробных свойств. Эти виды в большей степени патогенны для животных, но и у человека вызывают разнообразные поражения, хотя их регистрируют сравнительно редко. Поражения развиваются как при употреблении различных загрязненных животных продуктов, так и эндогенно, из имеющихся очагов. Патогенез поражений аналогичен прочим стрептококковым инфекциям. Дефектные (прихотливые) виды (*S. defectivus*, *S. adjacens*), требующие для роста внесения в среду пиридоксина (витамина В6), вызывают редкие случаи эндокардитов, и их выделяют из гемокультур. Дифференцировку проводят на основании результатов реакций латекс-агглютинации и изучения биохимических особенностей.

#### Бактерии рода Enterococcus

Род *Enterococcus* образуют овальные бактерии размером 0,6-2,0×0,6-2,5 мкм, в мазках культур, выращенных на жидких средах, располагаются парами или короткими цепочками. Спор не образуют, некоторые виды ограниченно подвижны (имеют небольшие жгутики), капсул не имеют. Факультативные анаэробы; хемоорганотрофы (метаболизм ферментативный); расщепляют различные углеводы с образованием кислоты (преимуществен молочной) без газа. Пищевые потребности сложные, каталаза-отрицательны, в редких случаях восстанавливают нитраты. Растут в интервале 10-45°C (оптимум 37°C) Типовой вид – *E. faecalis*.

Широко распространены в природе, обитают в кишечнике различных позвоночных, вызывают нагноения ран, бактериемии и поражения мочевыводящей системы. У человека наиболее часто поражения вызывают *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. durans*; их отличительные признаки приведены в таблице 5.

Распространение. Энтерококки входят в состав микрофлоры ротовой полости, кишечника и мочеполовой системы; так, *E. faecium* выделяют у 25 % клинически здоровых лиц. Большинство инфекций, вызванных энтерококками, носит эндогенный характер, частота подобных инфекций возрастает на фоне высокой частоты применения цефалоспоринов широкого спектра действия.

Лабораторная диагностика. Выделение возбудителя обычно не представляет трудностей (рис. 6), т.к. энтерококки хорошо растут на простых средах; на кровяном агаре могут давать зоны полного (редко) или неполного гемолиза. Через 24 ч энтерококки образуют сероватые колонии диаметром 0,4-1 мм; признаками, дифференциирующими их от зеленящих стрептококков, проявляют способность расти на средах, содержащих 6,5 % NaCl, а также способность изменять окраску лакмусового молока или молока с этиленовым синим через 4-6 ч при 37°C.

#### Анаэробные спорообразующие палочки

Эта группа анаэробных бактерий включает виды, далекие друг от друга в систематическом отношении. Основной и быстро выявляемый дифференцирующий признак

внутри этой группы – морфология бактериальных клеток. В соответствии с этим выделяют бактерии правильной (клостридии) и непрвильной (актиномицеты и бифидобактерии) формы.

Общие признаки этой группы:

- не способны расти в присутствии кислорода,
- представлены полиморфными (ветвящимися и неветвящимися) па-лочками, положительно окрашиваются по Граму,
- клостридии образуют споры.

Таблица 5. Основные отличительные признаки энтерококков, пато-генных для человека.

Признак	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Подвижность	–	± (11–20% изолятов)	± (11–20% изолятов)
Рост при 45°C	+	+	+
Рост при 50°C	–	± (11–20% изолятов)	+ (80–89% изолятов)
Рост на средах, содержащих:			
6,5% NaCl	+	+	+
0,04% теллурита	–	+	–
молоко с 0,1% метиленовым синим	+	+	?
Образование желтого пигмента	–	–	–
Гемолиз	α, β	Иногда α	Иногда β
Гидролиз гиппурата	±	±	+ (80–89% изолятов)
Образование кислоты из:			
Рамнозы	–	±	–
Сахарозы	–	+	±
Арабинозы	–	–	+
Глицерина	–	+	+
Сорбита	–	+ (80–89% изолятов)	–
Маннита	± (11–20% изолятов)	+	+ (80–89% изолятов)
Серологическая группа по Лэнсфилд	D	D	D

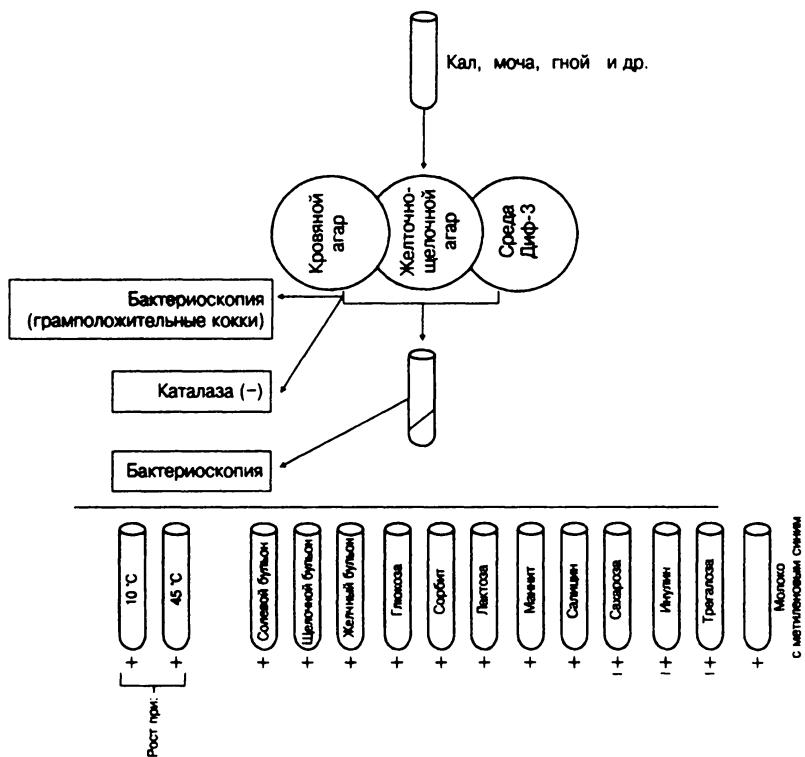


Рисунок 6. Принципиальная схема бактериологического выделения энтерококков.

#### Спорообразующие бактерии рода *Clostridium*

К роду *Clostridium* относятся подвижные палочки (реже неподвижные), величиной 1,5-20,0 мкм, с закругленными иногда с заостренными концами, часто расположенные в парах или короткими цепочками. Образуют овальные или круглые эндоспоры, придающие клеткам веретенообразную форму (от гр. *kloster* - веретено). С возрастом могут изменять отношение к окрашиванию по Граму, но на ранних стадиях культивирования всегда грамположительны. Большинство видов хемоорганотрофы, но некоторые могут расти хемоавто-трофно или хемолитотрофно; одни виды проявляют сахаролитическую, другие - протеолитическую активность (возможно сочетание этих свойств либо их полное отсутствие). Наиболее характерные признаки - способность вызывать масляно-кислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов (CO<sub>2</sub> водород, иногда метан). Восстанавливают сульфиты до сульфидов. Обычно каталазоотрицательные. Большинство видов - строгие анаэробы; также имеются аэротолерантные виды или отдельные штаммы. Типовой вид - *Clostridium butyricum*; вызывает масляно-кислое брожение углеводов, открытие этой палочки позволило Л. Пастеру (1861) выделить анаэробные микроорганизмы. Термин «клостридии» ввел Трекюль (1863). Род включает виды, обитающие в почве, на дне пресных и соленых водоемов, в кишечнике человека и животных; некоторые виды патогенны, а некоторые нашли применение в промышленном производстве некоторых органических кислот и спиртов. Современная систематика выделяет 5 групп микроорганизмов, разделяемых по расположению спор, способности гидролизовать желатин и особым требованиям для роста.

По экологическим свойствам выделяют 3 группы клостридий: возбуди-тели бродильных процессов (с преобладанием сахаролитических свойств); возбудители процессов гниения (с преобладанием протеолитических свойств); патогенные виды (могут быть протеолитическими и сахаролитическими).

## *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* - один из основных видов рода. Возбудитель зла-качественного отека, инфекционной энтеротоксемии животных, анаэробной дезентирии молодняка сельскохозяйственных животных, пищевых токсикоин-фекций человека. Основной возбудитель заболеваний человека - *Clostridium perfringens* типа А (*C. welchii*). *Clostridium perfringens* типа А открыли американские патологи Уэлч и Нэталл (1892), в чистой культуре получили Вейон и Жубер (1893), давшие ему название *perfringens*.

**Распространение.** Микроорганизм широко распространен в окружающей среде, его выделяют из воды, почвы и сточных вод, часто обитает в кишечнике людей и животных; *Clostridium perfringens* также способны вегетировать в почве, богатой гумусом. Наиболее часто в почве и испражнениях обнаруживаются серотип А. Место постоянного обитания представителей серотипа С, ответственных за пищевые токсикоинфекции у человека, пока не установлено, возбудителей выделяют из мясных и рыбных консервов.

**Морфология и культуральные свойства.** Вегетативные клетки - крупные, строго грамположительные, жгутиков не имеют (рис. 7), неподвижны (один из немногих неподвижных видов). Классические формы представлены короткими палочками с обрубленными под прямым углом концами (0,6-1,0  $\times$  1-1,5 мкм). Морфология может варьировать (антибиотики, ионы металлов, радиоактивное облучение), например, *in vitro* на углеводных безбелковых средах могут образовывать коккобациллярные формы, а на белковых безуглеводных средах - нити с заостренными концами длиной до 145 мкм. *In vivo* образуют капсулы (единственный капсулобразующий вид среди патогенных клостродий). В течение некоторого времени капсулы сохраняются и при культивировании на средах, содержащих нативный белок, наиболее выражены у вирулентных штаммов, резистентных к фагоцитарным реакциям. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, в старых культурах могут быть грамотрицательными.

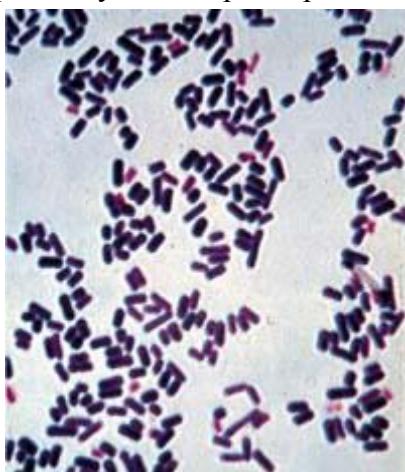


Рисунок 7. Морфология клеток *Clostridium perfringens*.

Споры *Clostridium perfringens* - крупные, овальные, расположены центрально (у *C. perfringens* типа А - также субтерминально), клетка-спорангий практически не деформируется. Термоустойчивость спор серотипов В и D относительно невысока (погибают при кипячении в течение 15-30 мин), споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении и даже автоклавировании в течение 1-6 ч. Спорообразование обычно имеет место в почве и кишечнике, *in vitro* споры можно получить на щелочных средах, богатых белком и не содержащих утилизируемых углеводов (например, на

свернувшейся лошади-ной сыворотке) Спорообразование стимулирует прогревание при 75°C в течение 10-15 мин.

Тип А *Clostridium perfringens* типа А - факультативный анаэроб (в сравнении с другими клостридиями) и относительно толерантен к кратковременным кислородным воздействиям, хотя имеются чувствительные штаммы, погибающие при воздействии O2 на культуру в течение 3 мин. Способен расти в высоких столбиках сред без герметизации вазелином.

Морфология колоний. *Clostridium perfringens* типа А значительно варьирует от условий выращивания на плотных питательных средах обычно образуются S- и R-колонии. S колонии круглые, сочные, куполообразные, с гладкими ровными краями, в начале роста прозрачные, напоминающие капли росы, позднее становятся мутными, серовато-белыми. R-колонии неправильной формы, бугристые, с неровными шероховатыми краями, в глубине агара напоминают комочки ваты. У некоторых штаммов отмечают слизистые M-колонии, особенно у слизистых вариантов *C. perfringens* типа А, образующих густую слизь на жидких средах, напоминают S-колонии с более высоким куполом и слизистой консистенцией; представлены капсулированными клетками. Иногда можно наблюдать смешанные O-колонии.

На агаре Цейсслера через 12-18 ч образует гладкие сероватые колонии с ровными краями и плотным возвышением в центре. Колонии окружены зоной гемолиза, он может быть полным либо частичным. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг колоний полный гемолиз (за счет действия гемолизинов), на отдалении - неполный (за счет действия лецитиназы). При контакте с кислородом колонии могут приобретать зеленоватую окраску.

На желтом агаре образует колонии окруженные зоной перламутрового преципитата (фосфорилхолин) образующегося из лецитина куриного желтка под действием лецитиназы.

Характерный признак колоний *Clostridium perfringens* типа А - способность менять серовато-белый цвет на зеленовато-оливковый после кратковременного пребывания в аэробных условиях (может служить дифференциально диагностическим признаком).

Колонии в толще питательной среды имеют вид чечевичных зерен, дисков или комочеков ваты.

Рост на жидких и полужидких средах, особенно содержащих глюкозу, происходит очень бурно с образованием H2, и CO2, и обычно заканчивается через 8-12 ч; при стоянии среда постепенно светлеет и образуется обильный осадок, культуры *Clostridium perfringens* типа А имеют характерный запах масляной кислоты. Оптимум pH 7,2-7,4, но могут расти в интервале 5,0-8,5. Первые признаки роста на среде Китта-Тарроци могут проявляться уже через 1-2 ч (особенно при 43°C); последние проявляются появлением пузырьков газа из-под кусочков печени при встряхивании. Помутнение среды и активное газо-образование можно наблюдать через 4-8 ч культивирования.

Выделяют 6 сероваров (A-F) *Clostridium perfringens*, различающихся по антигенным свойствам продуцируемых экзотоксинов. Все серовары образуют  $\alpha$ -токсин (лецитиназу). Тип А включает много подтипов, идентифицируемых реакциями агглютинации что облегчает диагностику в случаях пищевых токсикоинфекций и анаэробных раневых инфекций.

Метаболическая активность. *Clostridium perfringens* расщепляет с об разованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннозу, крахмал, гликоген и инозит; глицерин разлагают не все штаммы, не сбраживает

маннит, дульцит; редко ферментирует салицин и инсулин. От прочих клостридий *C. perfringens* отличает способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу. Протеолитическая активность слабая; разжижает желатин, не разлагает казеин; только некоторые штаммы медленно разжижают свернувшуюся сыворотку. Интенсивно створаживают молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка уже через 3 ч (феномен известен как «штормовая реакция»)

Для человека патогенны *Clostridium perfringens* типов A, C и D; типы B, C, D и E вызывают аналогичные заболевания у сельскохозяйственных животных (табл. 6).

Токсины *Clostridium perfringens* образует как минимум 12 идентифицированных токсинов (ферментов) и энтеротоксинов; у гиалуронидазы и дезокси-рибонуклеазы (□- и □-токсины) токсичность не доказана; □-, □-, □-, □-, □, □- и □-токсины обладают летальным свойством, но их биохимическая активность изучена недостаточно, и только □-, □- и □-токсины – ферменты с выраженным токсическим действием. Мишени для действия основных токсинов – биологические мембранны в различных тканях, в основе поражения находятся ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком, который сопровождается снижением окислительно-восстановительного потенциала в клетках, активацией эндогенных протеаз, приводящих к аутолизу тканей, характерному для газовой гангрены.

□-Токсин (лецитиназа С) проявляет дерматонекротизирующее, гемолитическое и летальное (убивает лабораторных животных при внутривенном введении) действие, опосредованное лецитиназой (фосфолипазой) активностью (разлагает лецитин на фосфорилхолин и глицериды), производят все типы *Clostridium perfringens*, но наиболее интенсивно тип A.

Таблица 6. Заболевания вызываемые *C. perfringens*

Тип	Заболевание
A	Газовая гангрена людей и животных, лицевые токсикоинфекции
B	Дизентерия молодняка сельскохозяйственных животных, энтеротоксемия овец и коз
C	Некротический энтерит человека, геморрагическая энтеротоксемия овец, коз, поросят и телят
D	Инфекционная энтеротоксемия человека, овец, коз, кроликов, телят, «травяная болезнь» лошадей
E	Энтеротоксемия телят и ягнят

□-Токсин вызывает некроз тканей и оказывает летальное действие на морских свинок альбиносов, гемолитического действия не оказывает, активность *in vivo* реализуется в развитии некротических энтеритов, основные продуценты – типы B и C.

□-Токсин проявляет гемолитическую активность в отношении эритроцитов барана, но не в отношении эритроцитов кролика или лошади, оказывает летальное действие на лабораторных животных, основные продуценты – типы B и C.

□-Токсин оказывает гемолитическое (кислород-чувствительное), дерматонекротизирующее и летальное действие, разрушает эритроциты барана и лошади, а также (незначительно) мыши, основной продуцент – *Clostridium perfringens* типа C, типы A, B, D и E образуют его в меньших количествах.

□- и □-токсины оказывают летальное и дерматонекротизирующее действие, протоксины, выявляемые в фильтратах культур, активируются трипсином. □-Токсин производят типы B и D, □-токсин – штаммы типа E.

□-Токсин (коллагеназа и желатиназа) разрушает ретикулярную ткань мышц и коллагеновые волокна соединительной ткани, активно усиливает цистеин в присутствии

Fe<sup>2+</sup>, оказывает летальное и некротизирующее действие, продуценты - типы А, С, Е и некоторые штаммы типа D.

□-Токсин (протеиназа) расщепляет денатурированный коллаген и жела-тин, во многом действует подобно фибринолизину как и □-токсин, секретируется в форме протоксина, активируемого трипсином. Проявляет активность экзо-энзима, обуславливающего некротические свойства.

□-и □-токсины оказывают летальное действие на лабораторных животных; их биохимическая природа остается неизвестной.

□- и □-токсины по своей химической природе - гиалуронидаза и дезоксирибонуклеаза, □-токсин ответствен за повышение проницаемости тканей, □-токсин расщепляет нуклеиновые кислоты, тем самым нарушая реакции белко-вого синтеза. Фильтраты микробных культур *Clostridium perfringens* могут со-держать также различные токсические вещества (например, фибринолизин и гиалуронидазу).

Энтеротоксин образуют *Clostridium perfringens* типов А и С, вызывающие пищевые токсикоинфекции, по своей природе он термолабильный протеин, продуцируемый при споруляции бактерий в толстой кишке, его практически не образуют лабораторные культуры, и он быстро разрушается при термической обработке пищевых продуктов, что значительно затрудняет его биохимическое изучение и идентификацию; вызывает рвоту и диарею, оказывает летальное действие, а также обуславливает появление эритематозной кожной сыпи у лабораторных животных. Диарея развивается вследствие потери воды и электролитов за счет дилатации и повышения проницаемости капилляров.

Пищевые токсикоинфекции, вызванные серотипами А и С, приобретают все большую значимость и представляют актуальную проблему для здравоохранения большинства стран мира.

*Clostridium perfringens* типа А вызывает преимущественно токсикоинфекции легкой и средней тяжести, инкубационный период составляет 6-24 ч; заболевания развиваются остро, общие нарушения проявляются слабостью, головокружениями, повышение температуры наблюдают редко. Симптомы исчезают в последующие 12-24 ч. Летальные исходы наблюдают редко, обычно у ослабленных пациентов - пожилых лиц, хронических больных и детей с нарушениями питания. Следует помнить о способности микроорганизмов проникать в кровоток и вызывать тяжелый анаэробный сепсис.

Более тяжело протекает некротический энтерит, вызванный штаммами серотипа С. При острых формах болезнь может закончиться смертью пациента в течение 12-24 ч. Симптомы аналогичны поражениям, вызываемым бактериями серотипа А, и обусловлены действием □-токсина, подобные пациенты не-редко попадают на операционный стол с диагнозом «кишечная непроходимость», смертность достигает 35 %. Заболевание регистрируют достаточно редко; большое число случаев наблюдали в Германии после второй мировой войны (в 1945-1948 г.г. - 1056 случаев), а в настоящее время периодически отмечают в Новой Гвинее, что связано с особенностями национальной кухни.

Термоустойчивость спор. Даже внутри серотипа А она может меняться в зависимости от штамма.

— При варке мяса некоторые споры погибают в течение нескольких минут, тогда как другие выдерживают кипячение в течение часа и дольше (особенности штамма). Споры, находящиеся в жировой ткани, выживают на протяжении длительного времени (до 6 часов).

– Повышение температуры до 75°C стимулирует прорастание спор, температурный оптимум для роста в вареном мясе 43°C, в оптимальных условиях дочерние популяции образуются в течение 12-13 мин.

Лабораторная диагностика. В соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике (1979) предусмотрено обнаружение и идентификация токсина в содержимом тонкого кишечника в реакции нейтрализации на белых мышах. Параллельно проводится выделение и идентификация возбудителя по тинкториальным, культуральным и токсигенным свойствам, изучение ферментативных свойств не предусмотрено. Используются лабораторные животные.

Выделение проводят по общепринятой схеме (рис 8). При смешанных инфекциях можно прогреть исследуемый материал и выделить *Clostridium perfringens* из термоустойчивых спор, внесенных в питательную среду, с последующим развернутым анализом.

Идентификация микроорганизма осуществляется набором стандартных тестов - подвижность, серологические реакции и др.; *Clostridium perfringens* также можно идентифицировать по росту на яичном агаре: колонии *C. perfringens* окружены опалесцирующим белым «преципитатом», появляющимся под действием  $\square$ -токсина (лецитиназы C); образование зон преципитации можно ингибировать, насылив на половину чашки специфическую антисыворотку одновременно с посевом тест культуры.

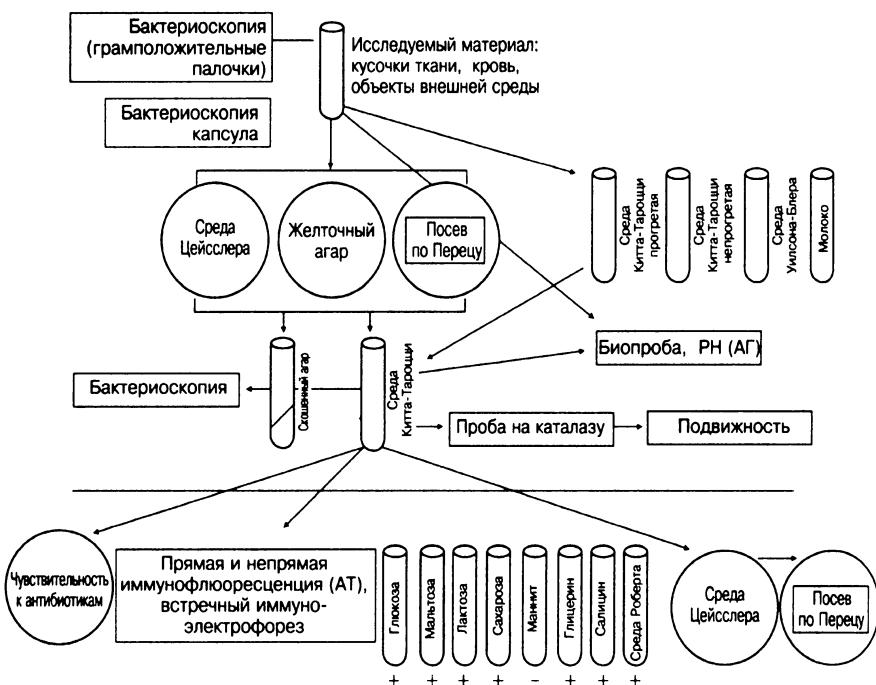


Рисунок 8. Схема бактериологического исследования на *Clostridium perfringens*.

#### *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* - возбудитель ботулизма - тяжелой, часто фатально заканчивающейся пищевой токсикоинфекции. В России первое клинико-эпидемиологическое описание ботулизма привел Зенгбуш (1818); возбудитель открыл ван Эрменген (1869).

Распространение. *Clostridium botulinum* широко распространен в почве. Заболевание регистрируют повсеместно, исключая районы вечной мерзлоты. Наиболее часто заболевания вызывают типы A и B, тип G первично выявлен в Аргентине, а тип E более

распространен в регионах, включающих большие естественные водоемы, - Северной Японии, области Великих озер (США, Канада), Швеции, Дании, Британской Колумбии (Канада), РФ, где бактерии настолько обильно колонизируют придонный ил, что отмечают случаи заражения рыб.

Периодическое пересыхание водоемов стимулирует рост *Clostridium botulinum*. Для профилактики интоксикаций продуктами промышленного производства при консервировании мяса широко применяют нитриты; в этом плане наибольшую опасность представляют мясные, рыбные и овощные консервы домашнего приготовления.

Естественный резервуар и источник инфекции - почва и различные животные.

Ботулизм (от лат. *botulus* - колбаса) - тяжелое пищевое отравление токсином *Clostridium botulinum*. Это крупные, подвижные, грамположительные палочки, образующие субтерминально расположенные споры, превышающие поперечник клетки, что придает им вид теннисной ракетки. Клостридии ботулизма - строгие анаэробы, оптимальная температура роста 30-37°C. Не развиваются и не продуцируют токсин при pH ниже 4,0, при температуре ниже 4-5°C, содержании NaCl 6-10 % (в зависимости от температуры). Вегетативные клетки погибают при 30°C через 30 мин; споры выдерживают кипячение до 6 ч, прогревание при 105°C – 1-2 ч, при 120°C - до 25 мин. В больших кусках мяса, в банках большой вместимости споры могут оставаться жизнеспособными и после автоклавирования. В замороженных пищевых продуктах споры сохраняют способность порастать в течение нескольких месяцев, Клостридии ботулизма продуцируют экзотоксин (нейротоксин) - наиболее сильный из всех известных микробных и химических ядов. Экзотоксин устойчив к действию соляной кислоты желудочного сока, к кипячению в течение 10-15 мин, а также замораживанию продуктов, маринованию, посолу, копчению. В консервах экзотоксин может сохраняться несколько месяцев.

Попадая с пищей в кишечник, токсин всасывается в кровь и поражает центральную нервную и сердечно-сосудистую системы.

Инкубационный период чаще 12-24 ч, но может быть и короче (2-6ч) и длительнее (несколько суток). Основные признаки заболевания: расстройство зрения, речи, параличи дыхательная недостаточность. Смертность от ботулизма довольно высокая. Только раннее введение лечебной антитоксической сыворотки позволяет добиться благоприятного исхода болезни.

Возбудитель ботулизма широко распространен в природе: в почве, воде, придонном щите, кишечнике рыб (особенно осетровых), теплокровных животных и птиц. Продукты, послужившие причиной отравления, различны: чаще всего это растительные консервы, особенно с низкой кислотностью, сыроподобные продукты, мясные и рыбные слабозасоленные, вяленые и копченые изделия, в большинстве случаев приготовленные в бытовых условиях или упакованные с вакуумированием. Развитие микробы и накопление токсических веществ могут происходить "гнездно" в виде очагов в толще продуктов, где создаются анаэробные условия. Этим объясняются единичные случаи отравления при употреблении одной и той же пищи многими лицами.

При размножении возбудителя обычно не наблюдаются органолептические изменения продукта; лишь в некоторых случаях отмечаются бомбаж банок консервов и сырный запах прогорклого масла.

Основные мероприятия по предупреждению ботулизма: защита сырья от попадания на него возбудителя, соблюдение режима стерилизации и хранения консервов, выполнение санитарно-технических требований при вылове, обработке, копчении и солении рыбы.

Случаи ботулизма вследствие употребления в пищу консервов промышленной выработки редки. В последние годы причиной ботулизма чаще являются консервы фруктовые, овощные, грибные домашнего приготовления, также рыбные продукты домашнего копчения и соления, что, очевидно, является следствием недостаточно тщательного мытья сырья, неправильной термической обработки и температуры хранения. Продукты домашнего консервирования лучше всего перед едой подвергать дополнительной тепловой обработке.

За последнее время усилилась опасность отравления, условленная токсином *Clostridium botulinum*, в связи с расширением использования продуктов, хранящихся в пленках под вакуумом и в газовых смесях.

Морфология возбудителя. Вегетативные клетки - палочки с закругленными концами размером 4-8×0,6-0,8 мкм (рис. 9), подвижны (перитрихи). При неблагоприятных условиях образуют эндоспоры, расположенные терминально и субтерминально. Строгие анаэробы; молодые культуры окрашиваются гратоложительно, 4-5-суточные - грамотрицательно. Оптимум pH для роста 7,3-7,6, для прорастания спор 6,0-7,2.



Рисунок 9. Морфология клеток *Clostridium botulinum*.

Морфология колоний. На кровяном агаре с глюкозой образуют очень мелкие сероватые или мутные желтоватые колонии линзообразной формы (на различных средах у одного и того же штамма могут варьировать). Вокруг колоний образуются зоны гемолиза различной ширины. На печеночном агаре образуют полиморфные звездчатые колонии, на желатине - сероватые, окруженные зоной разжиженного желатина. На столбике агара можно обнаружить диссоциаты, R-формы имеют форму чечевичных зерен, S-формы - пушинок. Хорошо растут на жидких средах (обычно на бульоне Тароцци, бульонах из гидролизатов казеина, мяса или рыбы) при условии предварительного удаления O<sub>2</sub> из среды кипячением в течение 15-20 мин с быстрым охлаждением. Вызывают помутнение среды и газообразование, иногда имеется запах прогорклого масла, но этот признак непостоянен.

Серологическая идентификация *Clostridium botulinum* основана на выявлении токсинов, по их структуре бактерии разделяют на 8 сероваров. Анти-генная структура бактерий остается малоизученной, показано наличие жгутиковых, группоспецифических и соматических, типоспецифических, не проявляющих токсических свойств. Оптимальная температура для токсикообразования вариабельна: для некоторых типов 35°C, для других - 28-30°C.

Биохимические свойства. Все типы *Clostridium botulinum* образуют желатиназу, лецитиназу и H<sub>2</sub>S, проявляют широкий спектр сахаролитической активности (бактерии

типов А, В, Е и F ферментируют глюкозу, левулезу, фруктозу, мальтозу и сахарозу типов С и D - глюкозу и мальтозу, тип G инертен к углеводам). *Clostridium botulinum* типов А и В обладают выраженными про-теолитическими свойствами, разлагают свернувшийся яичный белок и гидро-лизуют желатин По биохимическим свойствам выделяют 4 группы.

Бактерии I группы проявляют выраженные протеолитические свойства, гидролизуют желатин и эскулин, ферментируют глюкозу и мальтозу, проявляют липазную активность на яичном агаре.

Бактерии II группы проявляют сахаролитическую активность, но лишенны протеолитической.

Бактерии III группы проявляют липазную активность и гидролизуют желатин.

Бактерии IV группы гидролизуют желатин, но, в отличие от прочих возбудителей ботулизма не проявляют сахаролитических свойств и липазной активности, что послужило основанием для предложения выделить их в отдельный вид -*Clostridium argenticense*.

Патогенность *Clostridium botulinum* различна для различных видов млекопитающих; заболевания человека вызывают бактерии типов А, В, Е и F; *Clostridium botulinum* типов С и D вызывают заболевания животных и птиц (в редких случаях от больных животных выделяют бактерии типов А и В). Патогенность типа G для человека и животных не доказана.

Клинические проявления преимущественно обусловлены действием нейротоксина (т.к. в условиях организма размножение вегетативных форм *Clostridium botulinum* затруднено) и включают:

- классическую пищевую токсиционную инфекцию, более распространенную под названием «ботулизм»;
- раневой ботулизм (возникает при загрязнении некротизированных тканей почвой);
- ботулизм новорожденных (у детей от 3 до 20 нед), развивается при заглатывании спор с последующим развитием вегетативных форм (в США еже-годно регистрируют около 70 случаев);
- неопределенного классифицируемый ботулизм (у детей старше одного года и взрослых), не связанный с указанными факторами риска (пища, рана).

Фармакокинетическая активность токсинов различных типов *Clostridium botulinum* практически одинакова: все они сорбируются на клетках слизистой оболочки кишечника, проникают в кровь (где их можно выявить серологически) и в периферические нервные окончания. Токсины термолабильны, но для полной инактивации требуется кипячение в течение 20 мин.

Временной интервал между попаданием токсина в организм и появлением первых признаков ботулизма обычно не превышает 24 ч, но может варьироваться от 4-6 до 96 ч и более. Проявления зависят от природы продукта, ставшего причиной отравления, количества токсина, поступившего в организм, и состояния больного. Первые, но непостоянные признаки - расстройства ЖКТ (тошнота, рвота, боли в животе). Часто больные жалуются на сухость во рту или гиперсаливацию. Одновременно развиваются головная боль и нервно-паралитические явления - нарушение глотания, дисфагия и офтальмоплегический синдром; часто наступают односторонний или двусторонний блефароптоз и анизокория - результат поражения сфинктера зрачка. Циркуляция токсина в кровотоке приводит к уменьшению притока крови к правому предсердию. Кроме поражения ЦНС, ботулотоксин вызывает периферические паралитические явления нервно-мышечной передачи, проявляющиеся сначала

вялостью движений или полной адинамией с последующим развитием парезов и/или параличей глазных, глоточных и гортанных мышц, а также мышц шеи и конечно-стей.

Довольно часто случаи детского ботулизма связаны с кормлением детей медом. Первый такой случай зарегистрирован в 1943 г.

Токсин *Clostridium botulinum* - белок, оказывающий нейротоксическое действие. Представлен Zn<sup>2+</sup>-зависимыми эндопептидазами, при протеолизе разлагается на 2 связанных дисульфидной связью фрагмента (L- и H-цепи). Механизм биологической активности реализуется через связывание H-цепи с мембраной, проникновение токсина в клетку, формирование пор в пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной. Токсин разрушается при кипячении, легко кристаллизуется в белый хлопьевидный порошок. Токсины всех типов также оказывают гемолизирующую действие.

**Иммунитет.** Чувствительность к ботулиническому токсину у различных животных (в том числе одного вида) подвержена резким колебаниям. Абсолютно резистентные виды неизвестны, но всеядные животные обладают меньшей чувствительностью. Динамика заболевания не сопровождается выработкой значимых титров интитоксина, что связано с незначительной (с точки зрения иммуногенных свойств) дозой токсина, вызвавшей поражение. Перенесенное заболевание не оставляет антитоксического иммунитета. У выздоровевших пациентов в сыворотке определяют АТ к токсинам и микробным клеткам, что свидетельствует о комплексном характере иммунного ответа, направленного как на связывание токсина, так и на элиминацию возбудителя. Следовательно, ботулизм можно рассматривать не только как интоксикацию, но и как токсико-инфекцию (конечно, не отрицая ведущей роли токсина в патогенезе заболевания).

**Лабораторная диагностика.** Выделение возбудителя проводят по общепринятой схеме (рис 10). Лабораторному исследованию подлежат остатки пищевых продуктов, материал, полученный от больного, секционный материал.

Кровь исследуют только на наличие токсина с помощью биологической пробы на мышах (вводят 2 мл) или морских свинках (вводят 5-8 мл). Испражнения исследуют только на наличие возбудителя посевом на питательные среды, весь остальной материал - на наличие токсина и возбудителя. Банки с консервами выдерживают в термостате 10-12 сут, стерильно отбирают 50-100 г, растирают и центрифугируют, в надосадочной жидкости определяют токсин, в осадке - возбудитель. Мясо и рыбу обрабатывают спиртом и забирают пробы из внутренних частей (пробы рыбы рекомендуют брать от хребта и внутренних органов). Пробы изучают аналогично исследованиям консервированных продуктов.

**Факультативно-анаэробные спорообразующие грамположительные палочки**

Среди бактерий этой группы заболевания человека вызывают представитель рода *Bacillus* семейства *Bacillaceae*. Отличительными признаками бацилл являются:

- представлены крупными прямыми палочками, положительно окрашивавшимися по Граму,
- способны образовывать споры,
- единственным патогенным для человека видом выступает *B. Anthracis* (палочка сибирской язвы),
- некоторые условно-патогенные виды также способны вызывать пищевые интоксикации и госпитальные инфекции.

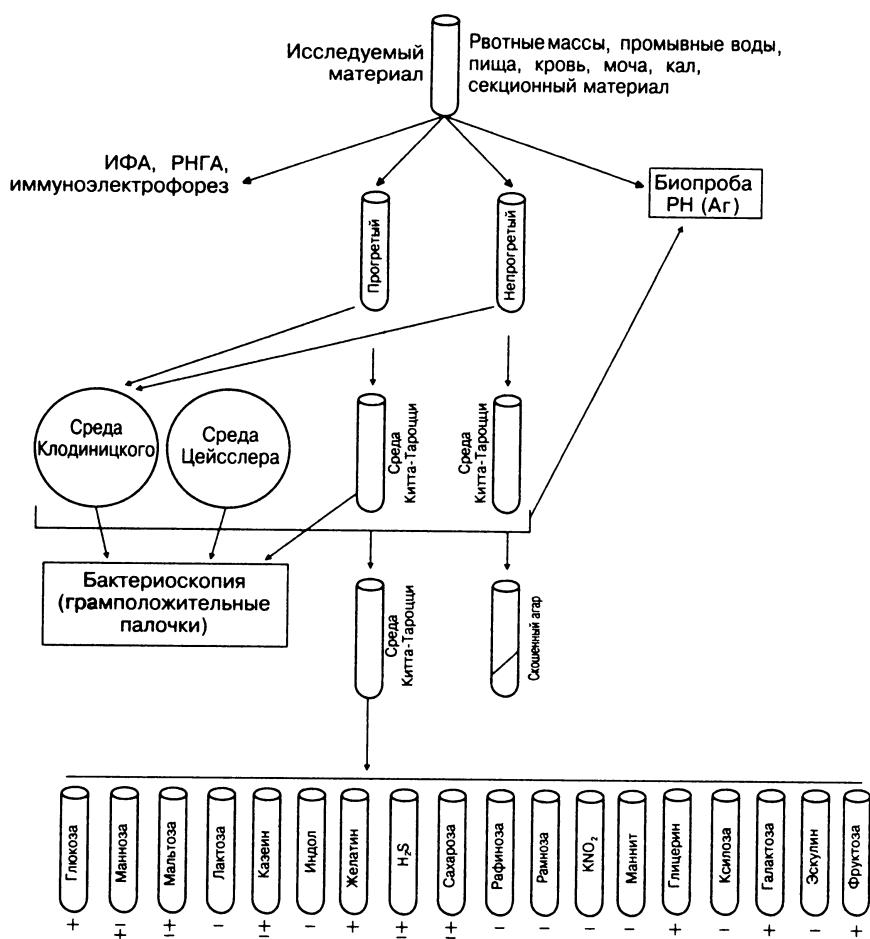


Рисунок 10. Принципиальная схема бактериологического выделения *Clostridium botulinum*.

#### Бактерии рода *Bacillus*

Прямые палочки до 10 мкм, с закругленными или обрубленными конца-ми, часто в парах или цепочками и подвижные (кроме *B. anthracis*) за счет пе-ритрихиальных жгутиков. Образуют эндоспоры, характеризующиеся повышенным коэффициентом светопреломления устойчивостью к повреждающим агентам и высоким содержанием дипиколиновой кислоты (5-20 % сухой массы) Род включает 48 видов; некоторые виды - строгие аэробы, другие - факультативные анаэробы. Клетка-спорангий образует одну эндоспору. Возможно изменение окрашивания по Граму, но на ранних стадиях роста бактерии грам-положительны. Хемогетеротрофы, метаболизм строго дыхательный или дыхательный и бродильный одновременно (редко строго бродильный); большинство видов образуют каталазу. Род *Bacillus* содержит несколько патогенных для человека видов (табл. 7); типовой вид - *Bacillus subtilis*.

Таблица 7. Поражения, вызываемые различными видами рода *Bacillus*.

Поражение	Возбудитель	Образцы для исследования
Сибирская язва	<i>B. anthracis</i>	Отделяемое из очагов поражения, кровь, СМЖ, сыворотка (для серологии)
Бактериемии, септициемии	<i>B. alvei</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	Кровь
Менингиты	<i>B. alvei</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	СМЖ

Глазные инфекции**	<i>B. brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i>	Биоптаты роговицы и стекловидного тела
Пневмонии	<i>B. cereus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i>	Мокрота, промывная жидкость бронхов, биоптаты легочной ткани, плевральная жидкость (при наличии)
Эндокардиты	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Кровь
Пищевые токсикоинфекции	<i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>	Подозрительная пища (25-50 г),

### Bacillus anthracis

Возбудитель сибирской язвы у человека и животных. Заболевание известно с глубокой древности, со времен Гиппократа и Гомера, Галена, Цельса и Виргилия болезнь фигурирует под названием «священный огонь» (*ignis sacer*) или «персидский огонь» (*ignis persicus*).

Русские врачи Колывано-Воскресенских заводов на Алтае А. Эшке (1758) и Н. Ножевщиков (1762) представили в медицинскую коллегию подробные сведения о данном заболевании, включая клинику эпидемиологию и связь с аналогичной болезнью у животных. В 1766 г. Моран доложил о данной болезни в Академии наук в Париже, что является первой научной работой по сибирской язве за рубежом. В 1769 г. Фурнье выделил сибирскую язву в отдельную нозологическую единицу. С.С. Андриевский, изучавший заболевание во время эпидемии на Урале (1786-1788) дал ему название «сибирская язва», а в 1788 г. путем самозаражения доказал единство этиологии сибирской язвы у людей и животных.

Возбудитель впервые описали Поллендер, Брауэлл (1849) и Давэн (1850). Чистую культуру возбудителя описал профессор Дерптского русского ветеринарного училища Ф. Брауэль (1857-1858). В своих опытах ему удалось заразить различных животных. Кох (1876) предложил питательные среды для размножения данных микроорганизмов, а в 1881 г. Пастер предложил живую вакцину для иммунопрофилактики заболевания. В связи с монополизацией ее производства Пастеровским обществом, Л. С. Ценковский независимо создал отечественную живую вакцину. В 1902 г Асколи разработал диагностическую реакцию преципитации, широко используемую на практике.

**Распространение.** Сибирская язва - типичный зооантропоноз; среди животных наиболее восприимчивы травоядные, но отмечены случаи заболевания среди зайцев, кошек и собак; у человека носит выраженный профессио-нальный характер (сельскохозяйственные рабочие, работники боен, шерсто-биты и щеточники).

Наиболее интенсивные очаги заболевания находятся в Азии (Турция, Иран, Китай, Монголия, Индия), Южной Африке, Южной Америке (Аргентина) и Австралии; спорадические случаи регистрируют в Европе, России и США. Ежегодно сибирской язвой заболевает около 1 млн. животных и регистрируют около 40 тыс. случаев заболевания у людей.

Животные заражаются при заглатывании спор во время выпаса или при поедании загрязненных кормов. У животных преобладают ангинозная, кар-бункулезная, кишечная и септическая формы заболевания, т.е. возбудитель проникает через микротравмы ротовой полости или стенку кишечника. Больные животные выделяют сибириеязвенные палочки с мочой и испражнениями. Болезнь быстро прогрессирует в течение 2-3 сут., а при молниеносных формах – в течение нескольких часов; летальность достигает 80 %. Клинические признаки болезни (судороги, диарея с кровью) проявляются непосредственно перед гибелью животного.

Человек заражается при контакте с инфицированным материалом (уход за больными животными, переработка шерсти, шкур, щетины, кожи и костей), либо при употреблении в пищу мяса больных животных. Пути заражения - ингаляция, заглатывание или проникновение через порезы и ссадины кожи спор *Bacillus anthracis*. Различают профессиональные (сельскохозяйственные, промышленные) и непрофессиональные (бытовые, случайные) группы заболевания. Ежегодно в мире регистрируют 25-100 тыс. случаев заражения.

Значительную эпидемическую опасность представляют скотомогильники, особенно если трупы животных, павших от сибирской язвы, были зарыты без надлежащих предосторожностей.

В сельских районах заболеваемость носит сезонный характер, пик заболеваемости приходится на летние месяцы.

Морфология возбудителя. Крупная толстая палочка (5-10×1-2 мкм) с закругленными концами (при образовании цепочек - с обрезанными под прямым углом концами); неподвижна (абсолютный дифференциально-диагностический признак); легко окрашивается по Граму (грамположительна) и анилиновыми красителями (рис. 11).



Рисунок 11. Морфология клеток *Bacillus anthracis*.

В исследуемом материале располагается парами или в виде коротких цепочек, окруженных общей капсулой; на питательных средах образует более длинные цепочки; при этом морфология палочек несколько изменяется - они слегка утолщены на концах и образуют сочленения («бамбуковая трость»). Подобные морфологические изменения еще более явно проявляются при температурной фиксации для окрашивания по Граму. Обработка культур пенициллином приводит к разрушению клеточных стенок и образованию цепочек, состоящих из протопластов («жемчужное ожерелье»).

Для защиты от факторов резистентности образуют капсулы, наблюдающиеся только у бактерий, обитающих в живых организмах либо на средах, содержащих нативную сыворотку. Капсулы более устойчивы к действию гнилостной микрофлоры, чем микробные тела, и в материале из разложившихся трупов нередко можно обнаружить лишь пустые капсулы («тени» микробов).

Для более быстрого обнаружения капсул, можно окрасить мазки полихромным метиленовым синим Леффлера (клетки синие, капсулы красно-малиновые). Образуют центрально расположенные эндоспоры, для чего необходимы кислород и определенная температура (12-42°C); в живом организме спор не образуют; также не образуют спор в невскрытых трупах, что обусловлено поглощением свободного кислорода в процессе

гниения. Споры отличает высокая устойчивость к внешним воздействиям; в воде сохраняются до 10 лет, в почве - до 30 лет (возможно и дольше).

Культуральные свойства. *Bacillus anthracis* хорошо растет на обычных питательных средах: бактерии можно даже выращивать на сыром или вареном картофеле, настое соломы, экстрактах злаков и бобовых. Темпера-турный оптимум на агаре 35-36°C, на бульоне 32-33°C оптимум pH 7,0. На жидких средах растет в виде ватных хлопьев, взвешенных комком, не вызывает помутнения среды. Дает характерный рост при посеве уколом в желатин («перевернутая елочка»); позднее верхний слой желатина разжижается, образуя воронку. На твердых средах образует крупные шероховатые серовато-белые колонии (R-формы) диаметром 2-3 мм, типичными считают характерные во-локнистые колонии («голова Медузы» или «львиная грива»), образованные переплетающимися цепочками бактерий. Рост вирулентных штаммов на плотных средах и желатине настолько характерен, что может служить диагностическим признаком. На свернувшейся (30 мин при 80°C) лошадиной сыворотке растет в виде гладких прозрачных S-колоний, тянувшихся за петлей.

Потребность в кислороде. Палочка сибирской язвы - аэроб или факуль-тативный анаэроб; в анаэробных условиях (либо при значительном варьировании температурного режима) образует мелкие единичные колонии. При культивировании в микроаэрофильных условиях всегда образует гладкие (S), слизистые (M) или смешанные (SM) колонии.

Спорообразование. Споры *Bacillus anthracis* овальной формы размером 0,8-1,0  $\times$  1,5 мкм; сильно преломляют свет. Они очень легко образуются на бедных питательных средах, а при свободном доступе кислорода - даже в ди-стилляте или нефиксированных мазках (последнее следует иметь в виду при работе с вирулентными штаммами). На плотных средах спорообразование идет быстрее, чем на жидких; через 32-48 ч при 37°C оно бывает практически полным. Прекращается полностью при 15°C и 42-43°C. Скорость прорастания зависит от температуры (оптимум 37°C) и возраста спор; молодые споры в оптимальных условиях прорастают за 1-1,5 ч, старые - за 2-10 ч.

Биохимия. Воздушитель образует кислоту без газа на средах с глюко-зой, фруктозой, мальтозой и декстрином. Слабое или отсроченное образование газа наблюдают на средах с глицерином и салицином (не у всех штаммов). Кислотообразования не находят на средах с арабинозой, рамнозой, маннозой, галактозой, раффинозой, лактозой, инсулином, маннитом, дульцитом, сорби-том и инозитом. Гидролизует крахмал; образует ацетилметилкарбинол и леци-тиназу. *Bacillus anthracis* очень медленно и слабо коагулирует жидкую жел-точную среду; нередко изоляты вообще лишены такой способности. Положительный результат можно ожидать не ранее 5-7 сут. инкубирования при 37°C; в то же время сапрофитные бациллы разлагают ее за 6-10 ч. В отличие от сапрофитов, палочки сибирской язвы лишены фосфатазы и не разлагают фосфаты, содержащиеся в питательной среде. Молоко свертывают за 3-5 сут.; затем сгусток медленно пептонизируется и разжижается; выделяется аммиак и (в связи с окислением тирозина) накапливается бурый пигмент.

Токсин обычно образуют *in vivo* (можно выделить из плевральных и перитонеальных экссудатов зараженных животных); *in vitro* образование токсина можно индуцировать культивированием на средах, содержащих сыворотку; пик образования приходится на 18-20 ч инкубирования. Структуры компонентов токсина представлены белками или липопротеинами; их молекулы термо-лабильны, серологически дифференцируемы и иммуногенны.

Патогенность *Bacillus anthracis* прямо зависит от капсуло- и токсино-образования; штаммы, не проявляющие подобные свойства, обычно авиру-лентны.

Капсула защищает бактерии от действия вне- и внутриклеточных продуктов фагоцитов и препятствует поглощению бактерий; на начальных этапах заболевания капсула - важнейший фактор вирулентности. Способностью к капсулообразованию также обладают некоторые вакциновые штаммы (например, Пастера или второй вакциновый штамм Ценковского).

Токсин опосредует проявление признаков и симптомов сибирской язвы. Аккумуляция токсина в тканях и его воздействие на ЦНС приводят к летально-му исходу на фоне легочной недостаточности и гипоксии. Разработаны сиби-реязвенные анатоксины, но их структура и механизмы действия изучены не полностью.

Лабораторная диагностика в определенной степени зависит от клинической формы заболевания. Для исследования берут содержимое пустулы, гнойное отделяемое из карбункула, кровь, мочу, мокроту, испражнения и рвотные массы. При патологоанатомическом исследовании забирают кусочки органов или целые органы. Все образцы следует помещать в герметичные сосуды и транспортировать закупоренными в опломбированные боксы. Анализы предусматривают не только проведение рутинных бактериологических исследований, но и заражение лабораторных животных для окончательного уточнения диагноза.

Выделение возбудителя проводят по стандартной схеме (рис. 12) с посевом на обычные питательные среды, определением подвижности, окраской по Граму и изучением биохимических особенностей.

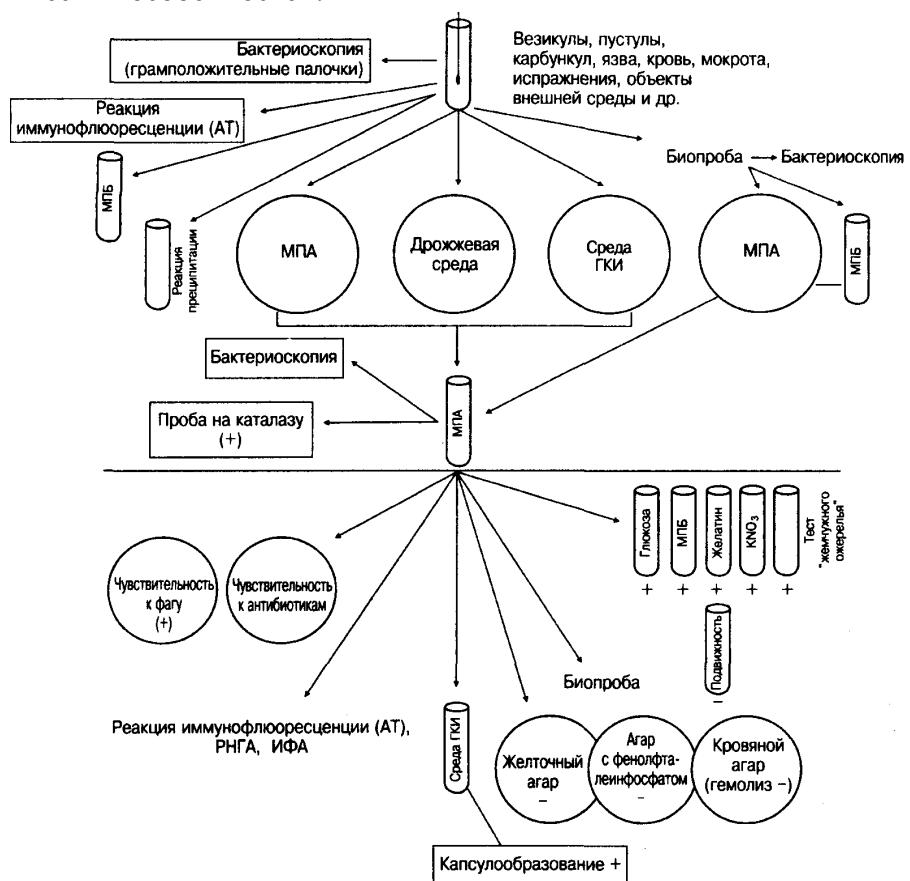


Рисунок 12. Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителя сибирской язвы

Типирование бактериофагом. Возможно проведение дифференциальной диагностики с помощью бактериофагов. Отличительная особенность возбудителя - высокая

чувствительность к пенициллину; выращивание на средах, содержащих пенициллин, приводит к проявлению феномена «жемчужного ожерелья».

Биологическая проба. Заражение подопытных животных проводят одновременно с посевом на питательные среды. Материал можно вводить белым мышам (по 0,1-0,2 мл в спину), кроликам и морским свинкам (по 0,2-0,5 мл в область живота). Обычно мыши погибают через 1-2 сут, морские свинки и кро-лики - через 2-4 сут. Наблюдение продолжают в течение 10 дней. У павших животных обычно исследуют печень, селезенку, лимфатические узлы, почки, кровь из полостей сердца, места введения заразного материала. Делают посевы на питательные среды.

#### *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (от лат. *cera* - воск, свеча) (рис. 13) широко распространена в природе, морфологически сходна с *Bacillus anthracis* (рис. 12) (характерно расположение микробных тел в виде штакетника), но обладает подвижностью, чувствительна к действию  $\square$ -фага бацилл и гемолизирует эритроциты барана. Вызывает спорадические случаи пищевых отравлений у человека. Температурный оптимум роста 30°C, оптимум pH 7-9,5.

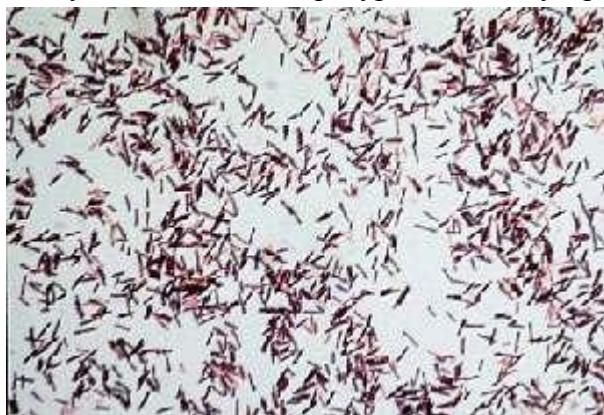


Рисунок 13. Морфология клеток *Bacillus cereus*.

На МПА образует «распластанные» колонии с неровными краями; на КА колонии «распластанные», зернистые, с широкой зоной гемолиза, на яичном агаре образует широкую зону преципитации белого цвета (эффект бактериальной лецитиназы), зона быстро растет и через несколько суток инкубации охватывает всю поверхность чашки. Колонии, выросшие на агаре, имеют характерный восковидный вид. На жидких средах образуют белый хлопьевидный осадок, нежную пленку на поверхности и вызывает помутнение бульона. Следует отметить высокую протеолитическую активность микроорганизма - разжижает желатин в течение 1-4 сут (80 % штаммов); все штаммы образуют лецитиназу и ацетилметилкарбинол, расщепляют до кислоты глюкозу и мальтозу, а часть штаммов - также и сахарозу, глицерин, лактозу, галактозу, инулин, дульцит и декстрин.

*Bacillus cereus* вызывает два типа пищевых отравлений (гастроэнтеритов); интоксикацию опосредует энтеротоксин, образуемый вегетирующими формами, прорастающими из спор устойчивых к определенным термическим режимам обработки пищевых продуктов (обычно овощей). Бациллы образуют токсины только *in vivo*, во время прорастания спор.

Заболевание развивается при употреблении пищи, обсемененной большим количеством микроорганизмов. Часть случаев отравлений в связи с употреблением жареного риса, содержащего проросшие споры *Bacillus cereus*, эти случаи не менее часто ошибочно связывают с отравлениями стафилококковым энтеротоксином. Подобные отравления можно

считать токсикозами (или гни-лостной инфекцией), связанными не столько с активностью токсина, сколько с действием метаболитов, накапливающихся в пищевых продуктах

Второй тип отравлений характеризует более продолжительный инкубационный период (около 17 ч); патогенез полностью опосредован действием энтеротоксина, больные жалуются на схваткообразные боли в животе, диарею; этот комплекс симптомов часто и ошибочно принимают за пищевые отравления, вызванные клоストридиами.

Патогенез обоих типов отравлений в большей или меньшей степени связан с действием энтеротоксина; механизмы его действия остаются до конца не изученными, но его активность не связана со стимуляцией аденилаткиназы.

Предрасполагающие факторы - различные нарушения иммунитета.

Вторичные иммунодефициты, вызванные применением цитостатиков и иммунодепрессантов, а также различными патологическими состояниями, сопровождаемыми иммунодепрессиями (например, острыми лейкозами), могут быть причиной тяжелых, часто фатальных инфекций *Bacillus cereus* с массированными бактериемиями, эндокардитами и менингитами.

Применение  $\beta$ -лактамовых антибиотиков для подавления роста *Bacillus cereus* может вызвать бурный рост резистентных штаммов.

**Диагностика.** Диагностическим признаком считают обнаружение в по-дозрительных продуктах более 105 бактерий в 1 г/мл продукта либо 102-103 бактерий в 1 г/мл каловых и рвотных масс или промывных вод.

**Аэробные неферментирующие грамотрицательные палочки**

Группу аэробных неферментирующих грамотрицательных палочек составляют неприхотливые бактерии, не требовательные к составу культуральных сред, что отличает их от других грамотрицательных бактерий. Из организма человека при различных поражениях выделяют представителей родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*. Среди инфекционных заболеваний у человека доминируют поражения, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa* (сине-гнойная палочка). Физиологические свойства этих бактерий более точно определяет термин «неферментирующие бактерии», так как они разлагают углеводы, не используя их в качестве источника энергии, а окисляют их, что легко установит при помощи теста Хью-Лейфсона.

Тест Хью-Лейфсона позволяет выявить способность различных бактерий окислять и/или ферментировать глюкозу. Для этого исследуемый материал засевают в две пробирки со средой, содержащей глюкозу. Первую инкубируют в аэробных условиях для выявления способности к окислению, вторую – в анаэробных условиях для выявления ферментации. Тест используют для дифференцировки псевдомонад, окисляющих глюкозу, от ферментирующих ее бактерий (энтеробактерий).

**Бактерии рода *Pseudomonas***

Представители рода *Pseudomonas* – прямые или слегка изогнутые палочки; средние размеры 0,5-1,0–1,5-5,0 мкм. Аэробы, метаболизм строго дыхательного типа (терминальный акцептор электронов – кислород), но некоторые виды используют нитраты в качестве альтернативных акцепторов электронов, что дает им возможность расти в анаэробных условиях. Многие виды акумулируют поли- $\beta$ -гидроксибутират в качестве резервного источника углерода (в мазках выявляется в форме суданофильтных включений). Хемоорганотрофы, некоторые виды – факультативные хемолитотрофы и используют Н<sub>2</sub> и СО в качестве источников энергии. Подвижны (один или несколько жгутиков расположены полярно), кроме бактерий вида *Pseudomonas mallei*; спор не образуют. Большинство (если не

все) видов не растут в кислой среде. Большинство окисляет глюкозу и другие углеводы (несахаролитические виды не способны к их окислению), а также каталазо-положительны. Многие виды свободноживущие либо считаются растительными и животными патогенами. Типовой вид - *Pseudomonas aeruginosa*. На основании гомологии РНК/ДНК изучаемые виды (их 27) *Pseudomonas* разделены на 5 гомологичных групп по структуре рибо-сомальной РНК и на несколько групп, имеющих гомологичную ДНК; соответственно предложено выделить из рода *Pseudomonas* некоторые микроорганизмы в роды *Burkholderia*, *Stenolrophomonas* и др. Вполне очевидно, что идентификация возбудителя инфекции до уровня вида может принципиально изменить характер эмпирической терапии, что обусловлено, в первую очередь, различиями в их природной чувствительности (устойчивости) к антибиотикам. Практическая необходимость видовой идентификации отдельных представителей семейства *Pseudomonadaceae* также обусловлена задачами эпидемиологической, эпизоотической диагностики.

#### *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка)

Один из основных возбудитель инфекционных поражений человека и животных, вызываемых псевдомонадами. Микроорганизм выделяют из кишечника 5 % здоровых лиц и до 30 % госпитализированных пациентов. Первое описание раневой инфекции, вызванной синегнойной палочкой, принадлежит Люке (1862), отметившему характерное сине-зеленое окрашивание перевязочного материала; в чистой культуре микроорганизм выделил Жессар (1882), изучивший его основные культуральные свойства. Первая вспышка госпитальной инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, зарегистрирована в 1897 г (Багински), но уже в 1899 г С.Н. Серковский указывал, что патогенные свойства микроорганизма чаще реализуются в организме лиц с ослабленным иммунитетом (детей и истощенных больных). Начиная с 70-х г.г. *Pseudomonas aeruginosa* - один из основных возбудителей локальных и системных гнойно-воспалительных процессов, особенно в условиях стационаров. Более того, была показана патогенность синегнойной палочки для рыб, различных млекопитающих и даже растений.

Распространение. *Pseudomonas aeruginosa* распространен повсеместно, выделяют из почвы, воды, с растений и от животных (водных или обитающих в ареалах с повышенной влажностью), вода имеет существенное значение в циркуляции возбудителя, в ней он может выживать до года (при 37 °C), в том числе во многих растворах, применяемых в практической медицине и ветеринарии, вплоть до жидкости для хранения контактных линз. Иногда входит в состав нормальной микрофлоры человека; у здоровых индивидуумов *Pseudomonas aeruginosa* выявляют на коже паха, подмышечных областей и ушей (до 2 % лиц), на слизистой оболочке носа (до 3 % лиц) и глотки (до 7 %), в ЖКТ (3-24 %). Поскольку возбудитель особенно обильно заселяет медицинское оборудование и циркулирует среди персонала и пациентов, то госпитализация существенно увеличивает колонизацию организма. Риск развития инфекции, вызванной синегнойной палочкой, существенно возрастает у больных с нарушениями барьерных систем и факторов резистентности. Инфицирование *Pseudomonas aeruginosa* вызывает до 15-20 % всех внутрибольничных инфекций, считается одним из основных возбудителей нозокомиальных пневмоний (до 20 %), вызывает треть всех поражений мочеполовой системы у урологических больных и считается причиной 20-25 % гнойных хирургических инфекций и первичных грамотрицательных бактериемий. В большинстве случаев источник инфекции и путь передачи обнаружить не удается, т.к. резервуарами возбудителя могут быть самые различные объекты (например, сырье овощи или букет цветов).

Часто синегнойную инфекцию наблюдают у больных с ожогами, забо-леваниями мочевого пузыря, особенно у пациентов, длительно получающих антибиотики, что обусловлено выраженной устойчивостью возбудителя.

Высокий риск развития наблюдают как у лиц с иммунодефицитами (вы-званными основной патологией), так и у лиц, длительно получающих цитоста-тики, глюкокортикоиды и антибиотики.

Морфологические признаки. Средние размеры 1-3×0,5-1 мкм; в натив-ных препаратах подвижны (имеют один или два полярных жгутика). В мазках чистых культур расположены одиночно, парно либо в виде коротких цепочек; в мазках из патологического материала их чаще можно обнаружить в цито-плазме фагоцитов, при этом палочки могут быть деформированы; в клиниче-ском материале полиморфизм отсутствует, а каких-либо включений не наблю-даются.

Синтезирует крахмалоподобное вещество, покрывающее тонким слоем микробную клетку, но не формирующее морфологически очерченного слоя. Более вирулентные штаммы синтезируют повышенное его количество (муко-идные штаммы), что дает основание рассматривать слизь как фактор патоген-ности. Наиболее часто мукоидные штаммы выделяют из мокроты больных при заболеваниях легких (например, при бронхэкстатической болезни). Формируя капсулное вещество в пораженном организме, изоляты могут легко терять это свойство в первых лабораторных генерациях. Обычно фиксированные препа-раты окрашиваются по Граму отрицательно.

Культуральные свойства. Растет в широком диапазоне температур (4-42°C), что указывает на способность длительно сохраняться в окружающей среде и противостоять защитному повышению температуры тела. Отличитель-ная особенность - ограниченная потребность в питательных веществах, обес-печивающая сохранение жизнеспособности в условиях почти полного отсут-ствия источников питания. При полном отсутствии углерода количество пало-чек и их ферментативная активность за неделю снижаются в 10-100 раз, при внесении минимальных количеств углеродсодержащих питательных веществ число палочек восстанавливается в короткие сроки. *Pseudomonas aeruginosa* хорошо растет на простых питательных средах в аэробных условиях при тем-пературе 30-37°C, а также и при 42°C (что можно использовать как дифферен-циально-диагностический признак). Образование слизи - характерная особен-ность; слизь придает характерную вязкость бульонным культурам и колониям мукоидных штаммов.

На жидких средах (например, пептонная вода, МПЖ, бульон Хоттинге-ра) образует характерную серовато-серебристую пленку; по мере старения культур возникает помутнение среды сверху вниз.

На плотных средах (например, МПА, КА, Эндо, Левина, Плоскирева, ЦПХ-агар) образует весьма разнообразные колонии; на средах Эндо и Плос-кирева обычно выделяют колонии следующих типов:

- плоские, неправильной формы, иногда склонные к слиянию, с волни-стыми краями;
- напоминающие S-колонии *Escherichia coli*;
- складчатые с неровной поверхностью («маргаритки»);
- слизистые или мукоидные колонии;
- карликовые или точечные, формирующиеся к 18-24 ч роста при 37°C.

При росте на плотных средах у многих штаммов наблюдают феномен радужного лизиса, развивающийся спонтанно. Феномен характерен только для *Pseudomonas aeruginosa*,

его можно рассматривать как таксономический признак. Более того, он индивидуально выражен у отдельных штаммов, и его можно использовать для внутривидовой дифференциальной диагностики. При об разовании пигмента окрашивает некоторые среды, например агар Мюллера -Хинтона или МакКонки, в зеленый цвет.

**Биохимические свойства.** *Pseudomonas aeruginosa* - выраженный хемоорганотроф; метаболизм дыхательный, никогда не бродильный; строгий аэроб. В качестве источника энергии синегнойная палочка использует Н<sub>2</sub> или СО. Универсальный акцептор электронов - молекулярный кислород. Как и большинство патогенных гноеродных микроорганизмов, каталазоположительна. Подобно прочим аэробам, синтезирует цитохромоксидазу (индофенолок-сидаза), а оксидазный тест - один из ведущих при идентификации этой палочки. Синтезирует триметиламин, придающий культурам запах жасмина, вино-града или карамели. Не нуждается в факторах роста. Способны расти на протяжении нескольких пассажей в чисто минеральной среде при добавлении подходящего единственного источника углерода. Ассимилирует ацетаты, пи-руваты, сукцинаты. Может утилизировать глюкозу, L-аланин при их содержании в среде не менее 0,5 %.

Протеолитическая активность сильно выражена. Разжижает желатин, свертывает сыворотку крови, гидролизует казеин; утилизирует гемоглобин (большинство патогенных штаммов на кровяном агаре образует зону D-гемолиза). Синтезирует гиалуронидазу; гидролизует не только белки, но и отдельные аминокислоты (например, валин и аланин). Лизин и орнитин не де-карбоксилирует; восстанавливает нитраты до нитритов и далее до молекулярного азота.

Сахаролитическая активность низкая; окисляет только глюкозу с образованием глюконовой кислоты.

Ввиду явного преобладания протеолитических свойств над сахаролитической активностью для идентификации синегнойной палочки среды Гисса для пестрого ряда готовят с малым содержанием пептона (до 0,1 %) и повышенной концентрацией углеводов (до 2 %). При посеве можно наблюдать, помимо четкой реакции с глюкозой, непостоянную ферментацию фруктозы и маннита. Тест Хью-Лейфсона положителен только с глюкозой (в аэробных условиях).

**Пиоцины.** *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует бактериоцины - пиоцины (аэргеноцины); способность к синтезу и чувствительность к ним широко варьируют у различных штаммов, на чем основано пиоцинотипирование псевдомонад, применяемое для внутривидовой дифференциальной диагностики культур. Вирулентные штаммы либо активно продуцируют пиоцины, либо подвержены их действию. В основу метода положены следующие положения. Пиоцины различных штаммов по-разному действуют на индикаторные штаммы. Штамм-продуцент пиоцина резистентен к образуемому им бактериоцину. Различные штаммы обладают разной чувствительностью к набору индикаторных пиоцинов.

Пиоцинотипирование используют при эпидемиологической оценке выделенных культур. Для разделения культур на пиоцинотипы используют два основных методических принципа.

– Типирование по продукции или активности пиоцинов в отношении набора индикаторных штаммов.

– Типирование по чувствительности штаммов к наборам известных индикаторных пиоцинов. Соответственно культуры получают наименования: «пиоцинотип» -

штамм или культура, подверженная литическому воздействию определенного типа пиоцина; «пиоциногенотип» - штамм или культура, обра-зующая определенный тип пиоцина.

Пигментообразование. Характерный и имеющий важное диагностическое значение признак (у 70-80 % изолятов). Среди пигментов наиболее часто встречают:

а. Водорастворимый феназиновый пигмент пиоцианин, окрашивающий питательную среду, отделяемое ран и перевязочный материал в сине-зеленый цвет. В анаэробных условиях пигмент обычно бесцветный, но даже встряхивание среды (частичная аэрация) приводит к появлению окраски.

б. Подавляющее большинство культур образует зеленый пигмент флюо-ресцеин, или лиовездин, флюоресцирующий при УФ-облучении (с длиной волны 254 нм); для обнаружения можно воспользоваться лампой Вуда.

в. Некоторые штаммы могут синтезировать и другие пигменты - пиору-бин (красный), пиомеланин (черно-коричневый), L-оксифеназин (желтый).

г. Оптимальная температура для синтеза пигментов *in vitro* 30-37°C. Кроме того, необходимо дополнение сред глицерином, аминокислотами (особенно аланином), ионами (особенно Mg<sup>2+</sup> и K<sup>+</sup>). Высоковирулентные штаммы отличает значительное образование пиоцианина, проявляющего свойства бак-териоцина, действующего на грамположительные и грамотрицательные бак-терии, а также имеющего умеренную фунгицидную активность.

д. При выделении культур иногда наблюдают атипичные непигментированные или слабопигментированные формы. Обычно их идентификация требует дополнительного тестирования, что усложняет диагностические исследования. Непигментированные штаммы составляют 8,3-18 %, а 6-37 % всех изолятов может быть пигментировано слабо.

Основные механизмы изменчивости культуральных признаков *Pseudomonas aeruginosa* - лизогенная конверсия и мутации.

Отсутствие или утрата способности к пигментообразованию также могут обуславливать сопутствующая микрофлора, действие антибиотиков, дефицит O<sub>2</sub>; или смена среды обитания с нарушением физиологических свойств бактерий, вызванных искажением белкового метаболизма в патологически измененных тканях, особенно при злокачественных новообразованиях.

Пиомеланин предохраняет микроорганизм от неблагоприятного действия изменений концентрации O<sub>2</sub> и УФ-лучей. Его наличие также помогает бактериям переносить гипоксию при инфекциях глубоких тканей. Подобные свойства пигмента дают основание считать меланинобразующие штаммы более вирулентными.

Патогенез. По сравнению с *Pseudomonas aeruginosa* подавляющее большинство микроорганизмов данной группы, обитая в почве и воде, имеют ограниченное клиническое значение (за исключением *B. mallei* и *B. pseudomallei* - возбудителей сапа и мелиоидоза соответственно). Высокая частота выделения и более выраженная патогенность *Pseudomonas aeruginosa* связаны с наличием у этого микроорганизма ряда факторов вирулентности, способствующих колонизации и инфицированию тканей организма человека. К детерминантам вирулентности относятся факторы, способствующие адгезии, инвазии, цитотоксичности.

Адгезия *Pseudomonas aeruginosa* к клеткам эпителия опосредуется вор-синками (пилями), которые обладают способностью специфически связываться с ганглиозидными рецепторами эпителия. Секретируемый микроорганизмом фермент нейраминидаза, отщепляя остатки сиаловых кислот от рецептора, облегчает специфическую адгезию.

Локальное и системное действие на организм млекопитающих оказыва-ют и другие секретируемые *Pseudomonas aeruginosa* ферменты. Фосфолипаза разрушает цитоплазматические мембранны эукариотических клеток, инактиви-рует опсонины, гидролизует сурфактант легких. Цитотоксическим действием (в том числе и в отношении макрофагов), а также способностью подавлять био-синтез белка обладает экзотоксин А. Биосинтез белка ингибируется также эк-зоинзимом S. Эластаза (протеаза II) разрушает иммуноглобулины и компонен-ты комплемента, ингибирует активность нейтрофилов. Функцию нейтрофилов и лимфоцитов подавляет токсин – лейкоцидин. Цитотоксическим эффектом об-ладает и пигмент пиоцианин, обусловливающий сине-зеленую окраску среды при выращивании микроорганизма в культуре или гнойного отделяемого ин-фицированных ран.

Мощным индуктором системной воспалительной реакции является ли-пополисахарид *Pseudomonas aeruginosa*. Часть штаммов продуцируют кап-сульный полисахарид альгинат. Штаммы, продуцирующие альгинат, обычно выявляются у пациентов с хроническими инфекциями. Альгинат способствует формированию на поверхности эпителия пленки, которая обеспечивает защиту патогена от воздействия факторов резистентности макроорганизма и антибио-тиков.

Для *Pseudomonas aeruginosa* характерно разнообразие весьма тонких механизмов регуляции, активность которых направлена на быструю адапта-цию микроорганизма к меняющимся условиям обитания и обеспечение макси-мальной экономичности с энергетической точки зрения. При пребывании мик-роорганизма во внешней среде факторы вирулентности не синтезируются, при попадании же во внутреннюю среду организма млекопитающих начинается интенсивный синтез этих белков, способствующих развитию инфекционного процесса. Сигналами для микроорганизма о попадании во внутреннюю среду могут быть изменения температуры, pH среды, контакт с мембраной эукарио-тических клеток. Распознавание таких сигналов осуществляют специфические рецепторы, локализованные в клеточной стенке микроорганизма. Передачу сигнала, обеспечивающего начало синтеза фактора вирулентности, от рецептора к гену, кодирующему белок, осуществляют двухкомпонентные системы передачи сигнала. Такие системы действуют по принципу последовательной активации ферментов в реакции фосфорилирования и являются универсальны-ми в регуляции вирулентности микроорганизмов. У *Pseudomonas aeruginosa* описаны двухкомпонентные системы, регулирующие образование ворсинок и синтез экзоэнзимов. Кроме регуляции синтеза факторов вирулентности на уровне отдельных микробных клеток, регуляция происходит и на уровне попу-ляции. Речь идет о феномене "кооперативной чувствительности" или "чувства кворума" (quorum sensing), заключающемся в накоплении в микробной популя-ции низкомолекулярных соединений (гомосеринлактонов), осуществляющих при достижении определенной концентрации депрессию синтеза большинства факторов вирулентности. Таким образом, экспрессия генов вирулентности ока-зывается зависящей от плотности микробной популяции. Биологический смысл феномена, вероятно, связан с координированным началом синтеза факторов вирулентности только после достижения микробной популяцией определенно-го уровня плотности. Регуляции на уровне кооперативной чувствительности у *Pseudomonas aeruginosa* подвержена экспрессия большинства факторов виру-лентности и вторичных метаболитов.

У *Pseudomonas aeruginosa* описана система секреции протеинов (так называемая протеаза III), обеспечивающая не только выведение экзоэнзимов из внутренней среды бактериальной клетки, но и их транслокацию внутрь эу-кариотической клетки, то есть к

чувствительным мишениям. К протеинам, секре-тируемым описанной системой, относятся и факторы вирулентности.

Таким образом, патогенное действие *Pseudomonas aeruginosa* в первую очередь обусловлено образованием веществ, проявляющих свойства экзоток-синов, и высвобождением эндотоксинов при гибели и распаде бактериальных клеток.

Экзотоксины бактерий представлены продуктами жизнедеятельности с широким спектром биологической активности; среди них основное значение имеют:

Экзотоксин А - белок; молекула токсина состоит из одной полипептидной цепи с 4 дисульфидными связями; свободных сульфогидрильных групп не содержит. Характерные особенности: наличие аргинина в качестве N-концевой аминокислоты и высокое содержание кислых аминокислот. Токсин термолабилен, расщепляется трипсином, панкреатической эластазой, проназой, а так-же под действием собственных протеолитических ферментов. Для синтеза *in vitro* необходимы: хорошая аэрация и соответствующая температура (оптимум 32°C).

Экзоэнзим S - белок с АДФ-трансферазной активностью; термостабилен; инактивируется под действием денатурирующих и восстанавливающих агентов, ионов Cu<sup>2+</sup> и Fe<sup>2+</sup>; АТ к экзотоксину А его не нейтрализуют. Образуется в двух формах: первая - ферментативно активный белок; вторая - неактивный белок-предшественник. В виде очищенного детергентами препарата нетокси-чен для животных (очевидно, инактивируется при очистке); *in vivo* вызывает глубокие патологические процессы в легких.

Цитотоксин оказывает выраженное цитотоксическое действие на полиморфноядерные нейтрофилы (первоначально назывался лейкоцидном, но позднее установлено патологическое действие на любые клетки); способствует развитию нейтропении. Вызывает ультраструктурные изменения в клетках, нарушения физиологических градиентов K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и глюкозы через повышение проницаемости клеточных мембран; последнее обусловливает набухание клеток и потерю крупных (например, белковых) молекул. Данный токсин синтезирует 96,7 % культур патогенных штаммов.

Гемолизины. Микроорганизмы образуют две гемолитические субстанции - термолабильный гемолизин с лецитиназной активностью (выше указанной как фосфолипаза С) - белок с необычно высокой для бактериальных фос-фолипаз молекулярной массой и термостабильный гемолизин - гликопептид, состоящий из L-рамнозы и 1-О-гидрооксидеканоиновой кислоты.

Образование обоих продуктов предполагает их функциональное взаимодействие: гликолипид подобно детергенту трансформирует фосфолипиды в растворимые формы (субстрат для фосфолипазы С), потенцируя тем самым ее активность. Эффективному высвобождению фосфатов способствует параллельный синтез бактериальной щелочной фосфатазы. Такое действие вызывает солюбилизацию и гидролиз фосфолипидов с образованием фосфорилхолинов - источника неорганических фосфатов; гемолизины приводят к развитию некротических поражений (особенно в печени и легких).

Эндотоксин и фактор проницаемости. Среди продуктов жизнедеятельности микроорганизма обнаружен энтеротоксический фактор - белковой природы, термолабильный, чувствительный к действию трипсина. Его патогенетическое значение оценить трудно, т.к. инфекции *Pseudomonas aeruginosa*, сопровождающиеся диареей, отмечают крайне редко (шанхайская, или 5-ти дневная лихорадка). Вирулентные штаммы

продуцируют фактор проницаемости (также лабильный к нагреванию и действию трипсина), участвующий в развитии патологических процессов в тканях.

Другой продукт жизнедеятельности (очевидно, участвующий в формирования поражений) - нейраминидаза (нарушает процессы метаболизма веществ, содержащих ненраминовые кислоты, например, в соединительно-тканых элементах). Нейраминидаза способна в 2-3 раза усиливать действие других токсинов. Также следует обратить внимание на способность *Pseudomonas aeruginosa* синтезировать протеолитические ферменты (по крайней мере, 3 различные протеазы, отличающиеся по своим характеристикам и субстратной специфичности).

Протеаза I (нейтральная) образуется в очень незначительных количествах; данные о ее субстратной специфичности и участии в патологических процессах отсутствуют,

Протеаза II (эластаза) обуславливает 75 % всей протеолитической активности; расщепляет эластин, казеин, гемоглобин, фибрин, Ig, комплемент и другие белки, но слабо действует на коллаген. Мишень - пептидные связи между гидрофобными аминокислотами. Относится к металлопротеиназам и инактивируется хелатами, ионами тяжелых металлов и сывороточным  $\alpha$ -макроглобулином. Синтезируется как связанный с клеткой профермент, аккумулирующийся в периплазматическом пространстве. Активируется путем ограниченного протеолиза щелочной протеазой или готовой порцией эластазы. Обнаружена у 85 % штаммов.

Протеаза III (щелочная протеаза) гидролизует многие белки (в том числе  $\alpha$ -интерферон), но не расщепляет эластин; внутривенное введение очищенного препарата вызывает кровоизлияния практически во всех внутренних органах; внутрикожное введение приводит к местным, позднее некротизирующимся кровоизлияниям.

Коллагеназа вызывает гидролиз коллагена в соединительных тканях. Основной фактор вирулентности при инфекционных поражениях роговицы.

Несмотря на наличие большого набора факторов вирулентности, синегнойную палочку следует рассматривать как оппортунистический патоген, т.к. инфекции редко наблюдают у лиц с нормальной резистентностью и неповрежденными анатомическими барьерами. Большинство штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обладает поверхностными микроворсинками, обеспечивающими адгезию к эпителию (наиболее выраженную в воздухоносных путях). Взаимодействие с клетками реализуется через рецепторы, включающие N-ацетилнейраминовые кислоты; определенную роль играет и вырабатываемая бактериями слизь. Прикрепление к субстратам стимулирует дефицит фибронектина, наблюдаемый при многих заболеваниях, особенно при хронических заболеваниях легких. Псевдомонады - типичные внеклеточные паразиты, и их размножение прямо обусловлено способностью противостоять действию факторов резистентности. В частности, слизь и секретируемые цитотоксины затрудняют их элиминацию фагоцитами и иммунокомпетентными клетками, что особенно выражено у пациентов с иммунодефицитами. Бактерии образуют комплекс биологически активных продуктов, обеспечивающих их неорганическим фосфором (фосфолипазы), железом (сидерофбры, нарушающие связывание железа трансферрином), и метаболиты, нарушающие гомеостаз тканей и частично стимулирующие воспалительные реакции (например, протеазы гидролизуют эластин, способствуя внедрению *Pseudomonas aeruginosa* в ткани и секвестрации в артериальной стенке, а также активируют комплементарный каскад).

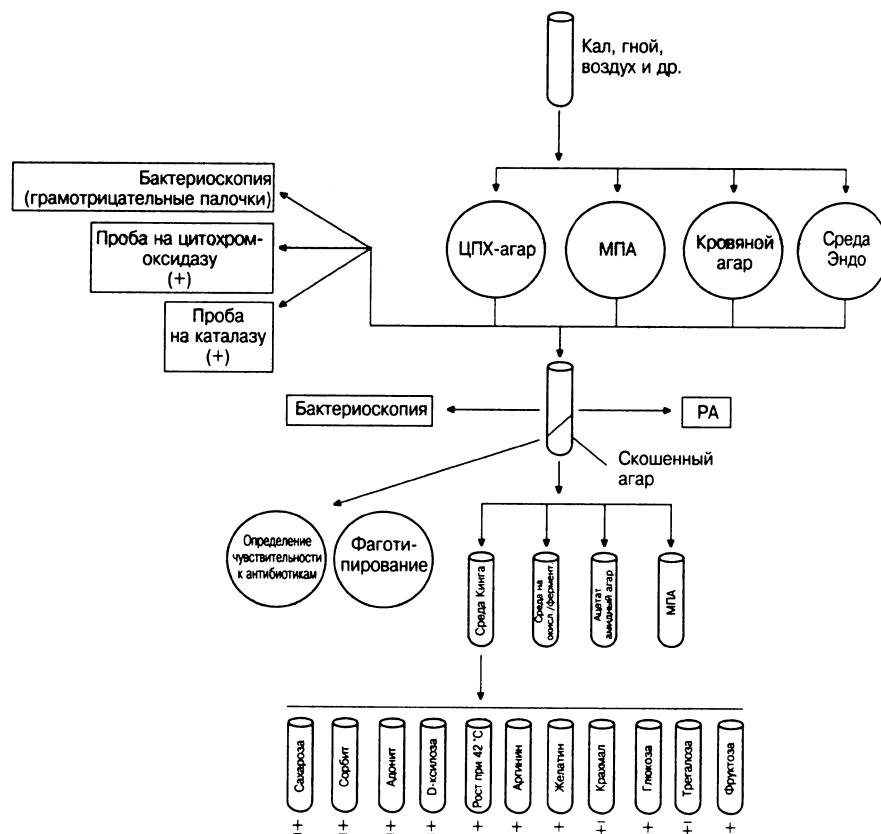
Лабораторная диагностика. На наличие синегнойной инфекции может указать голубовато-зеленое окрашивание краев и отделяемого ран, перевязочного материала

(особенно после обработки H2O2), развитие синдрома *ectyma gangrenosa* (патогномоничного для синегнойных септицемий) при ожогах, по-ражениях мочеполовой системы. Однако следует учитывать, что диагности-руют то или иное поражений только выделением возбудители. Существует несколько схем выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*. Наибо-лее распространенная приведена на рис. 19. Д.А. Васильевым и А.Э. Афониным предложена оригинальная схема выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, позволяющая в более короткие сроки идентифицировать данную культуру.

Схема (рис. 16) бактериологического выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, предложенная Васильевым Д.А., Афониным Э.А. включает следующие этапы:

1. Посев на накопительную среду УСХИ ( $37^{\circ}\text{C}$  24-48 часов).
  2. Перенос бактериальной суспензии на элективную среду КМ УСХИ ( $37^{\circ}\text{C}$  – 24 часа).
  3. Пересев выделенных колоний на ацетамидный агар, питатель-ный агар с хлоридом бария, МПА ( $42^{\circ}\text{C}$  – 24 часа).
  4. По результатам культивирования идентификация выделенной культуры.

Особые трудности представляет профилактика синегнойной инфекции, т.к. возбудитель также устойчив к действию антисептиков и дезинфицирующих средств. Более того, доказана возможность длительного сохранения возбудителя в растворах фурацилина, предназначенного для хранения катетеров и хирургического инструмента, а также для промывания ран. *Pseudomonas aeruginosa* способна вырабатывать факторы, нейтрализующие некоторые дезинфицирующие вещества, будучи аэробом, она может до 2 нед оставаться жизнеспособной в условиях анаэробиоза. В то же время она чувствительна к высушиванию, действию хлорсодержащих дезинфицирующих препаратов, легко инактивируется действием высокой температуры и давления (при кипячении, автоклавировании).



## Рисунок 16. Принципиальная схема бактериологического выделения *Pseudomonas aeruginosa*.

В любом случае для успешного проведения анализа важное значение имеет способ взятия исследуемого материала. Техника взятия и первичного посева материала аналогична таковой при лабораторной диагностике возбудителей других бактериальных инфекций.

Однако при взятии материала для исследования следует соблюдать и учитывать следующие важные моменты.

- Исследуемый материал желательно забирать до начала терапии антибактериальными препаратами или (если она начата) только после выведения препарата из организма.

- Материал для бактериологического исследования следует забирать непосредственно из очага поражения с соблюдением всех необходимых правил асептики.

- При невозможности взятия материала непосредственно из очага инфекции или если он сообщается с внешней средой, проводят исследование отдельного.

### Факультативно-анаэробные грамотрицательные ферментирующие палочки

Эту группу составляют разнообразные бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae*, обитающие в различных биотопах и предъявляющие различные требования к условиям культивирования. Их физиологические свойства точно определяет термин «ферментирующие бактерии», так как они ферментируют углеводы и утилизируют их в качестве источника энергии, что легко установить в тесте Хью-Лёйфсона.

#### Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*

Семейство *Enterobacteriaceae* (кишечные бактерии) включает более 20 родов, объединяющих более 100 видов бактерий. Семейство включает не-большие подвижные (перитрихи) или (реже) неподвижные споронеобразующие палочки. Некоторые имеют капсулы, особенно при первичной изоляции из клинических образцов. Энтеробактерии аэрофобы или факультативные анаэрофобы; большинство из них растёт на простых питательных средах, но некоторые имеют специфические потребности. Энтеробактерии хемоорганотрофы, разлагают углеводы с образованием кислоты и газа, но есть и газонеобразующие виды. Бактерии каталазаположительны и оксидаза отрицательны.

Энтеробактерии обитают на растениях и в почве, входят в состав микробных ассоциаций кишечника животных и человека. Кроме родов, включающих классические патогены, возрастает роль условно-патогенных бактерий, часто вызывающих оппортунистические инфекции. Условно-патогенные энтеробактерии могут вызвать до 50 % всех случаев септицемии, до 70 % гастроэнтеритов и более 70 % инфекций мочевыводящих путей. Поражения у человека вызывают бактерии родов *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter* и многие другие.

**Факторы патогенности энтеробактерий.** Патогенез поражений определяют термостабильные и термолабильные энтеротоксины, эндотоксины, сидерофоры, связывающие ионы  $Fe^{2+}$  (энтеробактины), факторы инвазивности (жгутики, интегрины) и адгезии (микроворсинки, поверхностные белки, агглютинины различной природы), факторы, обеспечивающие выживание бактерий в цитоплазме фагоцитов и сыворотке крови, гемагглютинины, ферменты и т.д.

Клинические проявления большинства поражений обусловлены воздействием липополисахаридного эндотоксина, высвобождающегося при гибели бактерий.

**Лихорадка.** Повышение температуры тела обычно происходит через 30 мин после попадания эндотоксина в кровоток.

**Артериальная гипотензия.** Небольшие дозы эндотоксина вызывают снижение артериального давления у большинства людей в течение 30 мин. Большие дозы могут вызвать выраженную и даже гипотензию.

**Внутрисосудистое свёртывание.** При повторном проникновении эндо-токсина в кровоток может развиваться синдром диссеминированного внутри-сосудистого свёртывания (тип ванного феномена Швартцмана), способный приводить к истощению факторов сильным кровотечением.

**Диагностические подходы.** При бактериологическом исследовании материала принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae* обычно устанавливают по основным морфологическим признакам, антигенной структуре и наличию (или отсутствию) определённых биохимических признаков. Основные идентифицирующие тесты, известные как минимальный дифференцирующий ряд: тест, ферментация углеводов, восстановление нитратов, реакция с метил-новым красным, образование ацетоина при ферментации глюкозы (реакция Фогеса-Проксауэра), тест с о-нитрофен-β-галактопиранозидом, образование индола, утилизация цитрата, гидролиз мочевины, декарбоксилирование и гидролиз аминокислот, дезаминирование фенилаланина или триптофана, образование H<sub>2</sub>S и тест на подвижность.

Большинство видов ферментирует глюкозу с образованием органических кислот, виды также выделяют водород и углекислый газ при ферментации глюкозы.

По способности сбраживать лактозу энтеробактерии разделяют на ферментирующие и неферментирующие. Для определения отношения к лактозе наиболее часто используют дифференциально-селективные среды Плоскирева и Мак-Конки.

Универсальная дифференциально-селективная среда для энтеробактерий - агар Клиглера.

Прочие биохимические тесты используют для идентификации отдельных видов.

**Бактерии рода *Escherichia***

Своё название бактерии получили в честь немецкого педиатра Т. Эше-риха, впервые выделившего *Escherichia coli* из содержимого кишечника детей. Род образуют подвижные (перитрихи) прямые палочковидные бактерии раз-мером 1,1-1,5x2,0-6,0 мкм. В мазках они располагаются одиночно или парами. У большинства штаммов существуют капсулы или микрокапсулы. Температурный оптимум для роста 37°C. Эшерихии ферментируют углеводы с образованием кислоты или кислоты и газа, отрицательны и каталазоположительны.

Они входят в состав микрофлоры толстой кишки теплокровных, пресмыкающихся, рыб и насекомых. Эшерихийная аэробная микрофлора кишечника, вызывающая, однако, обширную группу заболеваний человека, известных как ишерихиозы. Они характеризуются не только клиническим полиморфизмом, но и создают особую эпидемиологическую ситуацию. Основное медицинское значение имеет палочка (*Escherichia coli*). Кишечные палочки рассматривают как санитарно-показательные микроорганизмы (СПМ) при анализе воды и пищевых продуктов.

**Кишечная палочка (*E. coli*)**

В настоящее время среди прочих энтеробактерий кишечная палочка - основной возбудитель эшерихиозов у человека.

**Морфологические и культуральные признаки.** *E. coli* имеют типичную для энтеробактерий форму и представлена короткими подвижными палочками с закруглёнными концами.

- На плотных средах бактерии образуют плоские выпуклые мутные S-колонии с ровными или слегка волнистыми краями (3-5 мм в диаметре) либо сухие плоские R-колонии с неровными краями.

- В жидких средах растут диффузно, вызывая помутнение среды и образование осадка (реже формируют поверхностную пленку или пристеночное кольцо).

- На средах Хисса кишечная палочка может образовывать газ. На селективно-дифференциальных средах колонии принимают цвет, соответствующий окраске среды. На агаре Эндо лактоза-положительные эшерихии образуют фуксиново-красные колонии с металлическим отрицательные - бледно-розовые или бесцветные с тёмным центром. На среде Левина бактерии формируют тёмно-синие колонии с металлическим блеском, а лактозаотрицательные - бесцветные, на среде Плоскирева - соответственно красные с жёлтым оттенком или бесцветные. На КА могут давать полный гемолиз.

**Биохимические свойства.** По способности кишечной палочки ферментировать лактозу разделяют лактозаотрицательные и лактозаположительные. Бактерии образуют индол, восстанавливают нитраты, декарбоксилируют ли-зин.

**Патогенез поражений.** У человека кишечная палочка вызывает кишечные инфекции, бактериемии, менингиты и др.

**Кишечные инфекции (coli-инфекции).** *E. coli*, вызывающие диарею, разделяют на пять типов – энтеротоксигенные, энteroинвазивные, энтеропатогенные, энтерогеморрагические и но-оральный. Основной путь распространения эшерихий, вызывающих диарею, – фекальный. Наиболее часто человек заражается при употреблении контаминированной пищи (в том числе молока), воды, а также при контакте с животными. В стационарах и закрытых коллективах большее значение имеет контактный путь передачи. Поскольку эшерихий обитают в кишечнике многих животных, установить природный резервуар патогенных типов не представляется возможным.

Энтеротоксигенные *E. coli*, ETEC [англ. Enterotoxigenic *E. coli*] – возбудители диареи и токсикоинфекций. Факторы патогенности – пили, облегчающие адгезию бактерий на эпителии и способствующие колонизации нижних отделов тонкой кишки. Бактерии выделяют термолабильный и термостабильный энтеротоксины (гены токсикообразования передают умеренные фаги).

Низкомолекулярный термостабильный токсин увеличивает содержание циклического гуанин-монофосфата в клетках эпителия, что приводит к нарушению транспорта Fe<sup>2+</sup> и выходу жидкости из клеток.

Высокомолекулярный термолабильный токсин напоминает по структуре и механизму действия токсин холерного вибриона. Токсин состоит из двух компонентов: компонент В связывается с мембранами клеток эпителия, что позволяет компоненту А проникнуть в них.

Энteroинвазивные *E. coli*, EIEC [англ. enteroinvasive *E. coli*] – возбудители поражений, весьма напоминающих бактериальную дизентерию. Патогенез также носит свойства: подобно шигеллам энteroинвазивные кишечные палочки проникают и размножаются в клетках эпителия кишечника. Как и шигеллы, они неподвижны и не способны ферментировать лактозу. Поражения характеризуются выраженными болями в водянистой диареей с примесью крови. На инвазивность микроорганизмов указывает большое количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в испражнениях.

Энтеропатогенные *E. coli*, EPEC [англ. enteropathogenic *E. coli*] – основные возбудители диареи у детей. Патогенез поражений обусловлен адгезией бактерий на

эпителии и повреждением микроворсинок кишечника, но не инвазией в его клетки. Практически все серовары имеют плазмиду, кодирующую синтез белка, обозначаемого как энтеропатогенных *E. coli*. Заболевание протекает тяжело, может продолжаться 2 недели и более.

Энтерогеморрагические *E. coli*, ЕНЕС [англ. enterohemorrhagic] – возбудители геморрагической диареи (геморрагического колита) Ии гемолитического уремического синдрома (микроангиопатической гемолитической анемии, сочетающейся с почечной недостаточностью). Энтерогеморрагические эшери-хии выделяют цитотоксин, вызывающий гибель клеток, его образование кодирует ген, переносимый бактериофагом. Также практически все ЕНЕС образуют шигаподобный токсин 1 (веротоксин 1), аналогичный токсину *Shigella dysenteriae* типа 1, а большинство и шигаподобный токсин 2 (веротоксин 2, цитоток-син).

Энteroадгезивные *E. coli*, ЕАЕС [англ. enteroadherence *E. coli*], впервые выделены в 1985 г. Бактерии не образуют цитотоксины, не проникают в клетки эпителия и не имеют плазмидного фактора адгезии, существующего у ЕРЕС. Своё название получили за счет быстрого прикрепления к поверхности клеток.

**Бактериемия.** На сегодняшний день кишечная палочка - один из основных возбудителей бактериемии у детей и взрослых (17-35 %). У новорождённых 15-20 % случаев обусловлены манипуляциями на мочевыводящих путях. У взрослых лиц первичными источниками бывают мочевыводящие пути (в среднем 40-60 %) и кишечник (около 25-30 %). У новорождённых обычно отмечают нарушение терморегуляции, анорексию, респираторный дистресс-синдром, апноэ, рвоту, диарею, желтуху, гепатомегалию и сонливость. Для взрослых характерны лихорадка, спутанность сознания, судороги, артериальная гипотензия, олиго- и анурия или комбинации этих проявлений.

**Менингит.** Кишечная палочка - частый возбудитель менингитов у новорожденных (в среднем 1-5:1000 новорождённых, чаще у мальчиков). В большинстве случаев менингиты бывают осложнениями бактериемии и развиваются у 10-40 % новорождённых с подобной патологией. Основную группу риска составляют новорождённые с малой массой тела (менее 2500 г). Основные клинические проявления включают лихорадку, сонливость, рвоту, диарею, желтуху и менингеальные проявления. Летальность достигает 12 % у новорождённых после физиологических родов и до 35 % у новорождённых, относящихся к группе риска. У 20-50 % выживших отмечают остаточные неврологические расстройства.

**Респираторные инфекции.** Среди прочих поражений, вызываемых *E. coli*, часто встречаются респираторные инфекции, особенно у новорождённых, грудных детей и лиц преклонного возраста.

**Микробиологическая диагностика.** Цель бактериологического анализа - определение антигенных свойств бактерий, а не изучение их биохимических признаков, проводимое дополнительно для установления родовой принадлежности.

Первоначально проводят микроскопию мазков, окрашенных по Граму, и выполняют посев на селективно дифференцирующие среды.

Биохимическую активность определяют с помощью стандартных наборов либо проводят исследования на минимальном дифференцирующем ряду.

Из изолированных колоний готовят и микроскопируют мазки, ставят ок-сидазный тест и пробную реакцию с поливалентным ОК-антисыворотками (ОКА, ОКБ, ОКС, ОКД и ОКЕ). Последовательно используя весь набор ОК-антисывороток, определяют принадлежность живой культуры к ОК-группе. Культура не подлежит дальнейшему

исследованию при наличии агглютина-ции с несколькими сыворотками. Затем определяют принадлежность к О-группе в РА с прогретой при 100 0С культурой (для разрушения К-Аг) и адсор-бированными О-антисыворотками.

В клинических лабораториях иногда выделяют практически чистые культуры *E. coli*, тогда исследования ограничиваются определением роста на среде Плоскирева и способности к образованию индола.

**Лечение и профилактика.** Основу терапии эшерихиозов составляет назначение эффективных антимикробных средств (ампициллин, ко-тримоксазол, норфлоксацин и др.). Для лечения инфекций мочевыводящих путей также используют цефалоспорины и аминогликозиды. Средств специфической иммунопрофилактики нет. Профилактика коли-инфекции направлена на соблюдение санитарно-гигиенических правил, предупреждение инфицирования продуктов питания и размножения в пище микроорганизмов, уничтожение попавших микробов при помощи термической обработки.

#### Бактерии рода *Proteus*

Род назван в честь сына Посейдона - водяного бога Протея, способного менять свой облик, что отражает способность его представителей изменять внешние проявления роста на твёрдых средах. Род *Proteus* образуют прямые палочки размером 1,0-3,0x0,4-0,8 мкм. Бактерии подвижны – (перитрихи, по-движность более выражена при 20-22°C); капсул не имеют, хемоорганотрофы. оксидазаотрицательны, каталазаположительны. Они обитают в кишечнике многих видов позвоночных и беспозвоночных животных, почве, сточных водах и разлагающихся органических остатках. Некоторые виды вызывают инфекции мочевыводящих путей у человека, пищевые токсикоинфекции, а также вторичные септические поражения у пациентов с ожогами и после хирургических вмешательств.

**Культуральные свойства.** Протеи растут на простых питательных средах, температурный оптимум 35-37°C, оптимум pH 7,207,4. Рост бактерий сопровождается появлением гнилостного запаха. На твёрдых средах жгутико-вые (Н-) формы характеризуются сплошным ростом. При посеве бляшкой бактерии дают феномен «роения» - образуют концентрически расходящиеся зоны роста голубовато-серого цвета. На среде Плоскирева микроорганизмы формируют желтовато-розовые колонии - (в зоне роста среда подщелачивается и желтеет). На висмут-сульфитном агаре образуют серо-коричневые колонии (с черно-коричневой зоной под ними). На агаре Эндо формируют бесцветные колонии. Вызывают помутнение жидких питательных сред.

**Микробиологическая диагностика.** Она основана на выделении и идентификации возбудителя. Проводят посев исследуемого материала на диф-ференциально-диагностические среды (например, среду Плоскирева) и среды обогащения (например, 5 % жёлчный бульон). Идентификация бактерий рода *Proteus* – самая несложная во всём семействе *Enterobacteriaceae*. Их легко распознают по способности давать феномен «роения». У чистых культур определяют биохимические свойства на минимальном дифференцирующем ряду. Важнейший признак, отличающий протеи от прочих энтеробактерий, - способность дезаминировать фенилаланин. В сложных случаях для идентификации возбудителя можно воспользоваться специфическим бактериофагом. Антигennую структуру определяют РА живой и прогретой культуры с поливалентными О- и Н-антисыворотками.

**Лечение.** Протеи обладают природной устойчивостью ко многим антибиотикам. Препараты выбора - ампициллин, цефалоспорины третьего поколения, фторхинолоны. При дисбактериозах кишечника можно назначать интестибактериофаг (смесь фагов,

включающая протеинный фаг) внутрь. Протейный или коли-протейный фаг также применяют местно (при гнойных процессах или поражениях мочеполовой системы).

#### Бактерии рода *Vibrio*

Род *Vibrio* семейства *Vibrionaceae* отдела *Gracilicutes* образуют прямые или изогнутые подвижные палочки; подвижность обусловлена одним или не-сколькими жгутиками. Снаружи бактерии покрыты оболочкой, образованной выростом наружного слоя клеточной стенки. Бактерии хемоорганотрофы; большинство видов оксидазаположительны. Микроорганизмы чувствительны к вибриоститику (2,4-диамино-6,7-дизопропилптеридин). Ионы  $\text{Na}^+$  стимули-руют рост всех видов и необходимы для культивирования некоторых видов. Вибрионы распространены не только в пресных, но и солёных водоёмах, осо-бенно в эстуариях рек. Бактерии покрывают дно, растительность и колонизи-руют организмы водных животных. Некоторые виды патогенны для водных беспозвоночных и позвоночных животных; часть вибрионов также патогенна для человека. Наибольшее медицинское значение имеют *V.cholerae*, *V.parahaemolyticum* и *V.vulnificus*.

#### Возбудитель холеры (*V. cholerae*)

Холера – острое инфекционное заболевание, характеризующееся профуз-ной водянистой диареей, крайней слабостью, выраженной потерей жидкости и электролитов. Европейская медицина столкнулась с холерой лишь в первой половине XIX века; до этого времени холера вызывала эпидемии в ограничен-ном регионе полуострова Индостан. Основными воротами для прорыва возбу-дителя в Европу были некоторые регионы Ближнего Востока, Египет и порты Средиземноморья. На поиски возбудителя в Египет были направлены француз-ская (под руководством Э. Ру) и немецкая (под руководством Р. Коха) экспеди-ции. Затем немецкие бактериологи перенесли работу в Индию, где в 1883 г. была открыта знаменитая «запятая Коха».

Позднее были обнаружены многочисленные вибрионы, не имеющие никакого отношения к холере и отличавшиеся от её возбудителя способностью ли-зировать эритроциты. В соответствии с этим гемолитические виды стали счи-тать непатогенными. Критерий считали обоснованным до выделения супруга-ми Готшлих гемолитических вибрионов из трупов мусульман-паломников, по-гибших от холероподобной инфекции на карантинной станции Эль-Тор в Египте (1906). Поскольку в то время эпидемии не было, то и роль вибриона Эль-Тор осталась неясной. Но в 1939 г. возбудитель вызвал эпидемическую вспышку на острове Сулавеси (Индонезия), а позднее был признан этиологиче-ским агентом седьмой пандемии холеры. В начале 1993 г. появились сообще-ния о вспышках холеры в юго-восточной Азии, вызванных ранее вибрионами неизвестной серогруппы, обозначенных как серовар 0139 (Бенгál).

**Эпидемиология.** Холера - типичная кишечная инфекция, и многое в её эпидемиологии аналогично поражениям, вызываемым энтеропатогенными бактериями. Природный резервуар – больные и бактерионосители; основной механизм передачи - фекально-оральный, редко контактный. Факторы переда-чи - пищевые продукты, вода, объекты окружающей среды. Определенную роль играют мухи, способные переносить возбудитель с испражнений на пи-щевые продукты.

Холерный вибрион мало устойчив во внешней среде и плохо переносит инсоляцию, высушивание и конкуренцию со стороны другой микрофлоры. Циркуляция возбудителя в воде прямо связана с наличием больных и бактерионосителей; после их изоляции он спонтанно исчезает через несколько суток (в стоячих водоёмах может сохраняться до 2-3 нед). В выгребных ямах может существовать до 3-4 мес. Вибрион длительно сохраняется в

продуктах с щелочным рН и высокой влажностью, а также одежду и постельное белье, загрязненными испражнениями больных. Вибрионы биотипа Эль-Тор более устойчивы во внешней среде, что позволяет легко выделять их из воды и испражнений. Все вибрионы очень чувствительны к действию дезинфицирующих веществ, особенно с кислым рН.

Выделяют два типа эпидемий холеры - эпидемии-вспышки с единственным источником инфекции и путями распространения, характеризующиеся одно-моментным появлением большого количества больных, и вялотекущие эпидемии с перманентной заболеваемостью небольшого контингента и трудно выявляемыми путями передачи возбудителя.

Морфологические признаки. Клетки холерного вибриона размером 1,5-4,0x0,2-0,4 мкм имеют один полярный жгутик, снабженный чехликом и продольным выростом, напоминающим ундулирующую мембрану. Подвижность бактерий весьма выражена, и ее наличие (выявляют методом висячей или раздавленной капли) - важный диагностический признак. Для бактерий характерен полиморфизм - типичные формы наблюдаются в клиническом материале, в мазках из колоний доминируют палочковидные формы. Под действием пенициллина холерные вибрионы способны образовывать L-формы. Вибрионы хорошо окрашиваются анилиновыми красителями; обычно используют водный фуксин Пфайффера и карболовый фуксин Циля.

Культуральные свойства. Холерный вибрион предпочитают аэробные условия и быстро погибает в анаэробных. Температурный оптимум 370С. Вибрион хорошо растет на простых питательных средах с высоким рН (7,6-8,0); подобные галофильные свойства используют в подборе элективных сред.

На твердых средах возбудитель образует небольшие круглые дисковидные прозрачные S-колонии с ровными краями, голубоватые в проходящем свете, что сразу их отличает от более грубых и мутно-белых колоний энтеробактерий. Старые культуры несколько грубы и приобретают желтовато-коричневый оттенок.

На агаре с тиосульфатом, цитратом, солями желчных кислот и сахаро-зой *V. cholerae* ферментирует последнюю и образует желтые колонии. При посеве уколом в желатину через 48-72 ч микроорганизм даёт воронкообразное разжижение, верхняя часть которого при просмотре сбоку представляет пузырьком воздуха. Позднее разжижение увеличивается, полость заполняется белесой массой вибрионов. Холерный вибрион также образует неровные мутные R-колонии; бактерии из которых не чувствительны к бактериофагам, антибиотикам и не агглютинируются O-антисыворотками.

В жидких средах вибрион вызывает помутнение и образование нежной голубоватой пленки на поверхности, её края приподняты вдоль стенок пробирки; при встряхивании она легко разрушается и оседает на дно. На 1,0 % пептонной воде (рН 8,8-9,0) холерный вибрион растет, опережая бактерии кишечной группы, и образуют нежную голубоватую пленку и муть. Пептонная вода с добавлением 0,5-1,0 % NaCl - наилучшая среда накопления для возбудителя холеры.

Биохимические свойства. Вибрионы сбраживают с образованием кислоты многие углеводы (глюкозу, сахароазу, маннит, лактозу, гликоген, крахмал и др.). Ферментация маннозы, сахарозы и арабинозы (так называемая триада Хейберга) имеет диагностическое значение. По способности разлагать эти три углевода все вибрионы разделяют на 6 групп. Холерные вибрионы разлагают только маннозу и сахарозу и принадлежат к 1-й группе Хейберга. Бактерии этой группы обладают плазмокоагулирующим (свертывают плазму кролика) и фибринолитическим (разжижают свёрнутую сыворотку по Лёффлеру) свойствами. Они свертывают молоко и разлагают другие белки и их дериваты до аммиака и индола; H2S

не образуют, ют нитраты и образуют индол (эту способность учитывают в нитрозоиндоловой реакции, также известной как холера-рот реакция). На основании биохимических и биологических различий холерные вибрионы разделяют на два биовара - классический биовар (*V. cholerae* биовар *asiatica*) и Эль-Тор (*V. cholerae* биовар *eltor*). Бактерии серо-вара Бенгал устойчивы к полимиксину и не проявляют гемолитической активности.

Патогенез поражений. Попав в организм человека, значительная часть вибрионов погибает под действием кислой среды желудка, и лишь их небольшая часть достигает тонкой кишки. Способность холерного вибриона быстро колонизировать эпителий кишечника обусловливают жгутики, муциназа (разжижает слизь и облегчает проникновение к поверхности эпителия) и нейра-минидаза (обеспечивает взаимодействие с микроворсинками). В ответ на проникновение бактерий эпителиальные клетки выделяют щелочной секрет, служащий идеальной средой для размножения возбудителя. Основной фактор патогенности - способность к токсикообразованию. Холерные вибрионы образуют эндо- и экзотоксины.

Эндотоксин - термостабильный, сходный по структуре и активности с эндотоксинами прочих грамотрицательных бактерий. Однако этот токсин не играет существенной роли в развитии характерных проявлений.

Экзотоксин (холероген) - термолабильный белок; его образование кодируются как хромосомные, так и плазмидные гены. Молекула токсина включает 2 компонента - А и Б. Компонент Б взаимодействует с рецепторами эпителия тонкой кишки, облегчая проникновение в клетку компонента А. Компонент А составляют субъединица А<sub>1</sub> (активный центр) и субъединица А<sub>2</sub>, связывающая компоненты А и Б. Субъединица А<sub>1</sub> активирует аденилатциклазу, приводя к увеличению внутриклеточного содержания цАМФ и выходу жидкости и электролитов из клеток либеркюновых желёз в просвет кишечника. Токсин не способен реализовать действие на каких-либо других клетках. Бактерии серовара 0139 также синтезируют экзотоксин с аналогичными свойствами, но в меньшем количестве, серные вибрионы также секрецируют экзотоксины, аналогичные токсинам токсигенных шигелл и сальмонелл.

Клинические проявления. У большинства инфицированных лиц заболевание протекает бессимптомно, возможна лёгкая диарея. Соотношение тяжёлых поражений к количеству стёргенных проявлений для классической холеры составляет 1:5-10, для холеры Эль-Тор - 1:25-100.

Для клинически выраженных случаев продолжительность инкубационного периода составляет в среднем 2-3 дня. Заболевание проявляется общим недомоганием, болями в животе, рвотой и развитием выраженной диареи. Для последней характерно выделение значительного количества (до 10 л/сут) водянистых бесцветных испражнений («рисовый отвар»). В зависимости от степени интоксикации симптоматика может иметь характер гастроэнтерита или энтерита.

В тяжёлых случаях у больных резко снижается объём мочи с развитием острой почечной недостаточности. Характерна охриплость голоса или афония. Ведущие патогенетические факторы гиповолемия и выраженные нарушения электролитного баланса, вследствие чего развиваются артериальная гипотензия, сердечная недостаточность, нарушение сознания и гипотермия. Подобное состояние определяют как холерный алгид. Характерный признак обезвоживания - «гиппократово лицо» (*facies hippocratica*), запавшие глаза, заострённые черты лица с резко выступающими скулами. При отсутствии лечения летальность больных в алгидной стадии достигает 60 %. Выздоровление сопровождается

приобретением непродолжительной невосприимчивости. Нередко отмечают случаи повторного заражения.

**Микробиологическая диагностика.** Основу составляют выделение и идентификация возбудителя. Цели исследований – выявление больных и виб-рионосителей; установление причины смерти при исследовании трупов; контроль над эффективностью лечения больных и санации носителей, контроль над объектами внешней среды и эффективностью дезинфекционных мероприятий. Материал для исследований – жёлчь, постельное и нательное бельё, вода, ил, сточные воды, гидробионты, смывы с объектов окружающей среды, пищевые продукты, мухи и др. При проведении исследований необходимо соблюдать следующие правила:

Материал следует доставлять в лабораторию не позже 2 ч после забора (так как возбудитель быстро погибает). При невозможности срочной доставки образцы помещают в транспортные среды (1 % пептонная вода с pH 8,2-8,6).

Емкости для материала нельзя обеззараживать химическими веществами, так как возбудитель чувствителен даже к их следовым количествам. Все образцы помещают в герметически закрытую транспортную тару.

Посев проводят на жидкие среды обогащения, щелочной МПА, элективные и дифференциально-диагностические среды. Изучают рост на первой сре-де накопления и выполняют высев на щелочной агар и вторую среду накопле-ния, что повышает высеваемость возбудителя. Если на первом этапе при ис-следовании нативного материала ускоренными методами получают положи-тельные результаты, пересев на вторую среду накопления не проводят. Подозрительные колонии пересевают для выделения чистых культур.

Затем определяют морфологические, биохимические свойства и анти-генную структуру с помощью агглютинирующих O-, OR-, Инаба- и Огава-антисывороток. Важное диагностическое значение имеет типирование с по-мощью холерных диагностических бактериофагов. Все *Vibrio cholerae* лизи-руются бактериофагом IV группы, а вибрионы биовара Эль-Тор - фагами группы V.

Для ускоренной диагностики заболевания применяют иммунолюминес-центный и иммобилизационный методы. Нецелесообразно проводить бакте-риоскопию мазков и препаратов методом «висячей капли» из нативного мате-риала.

Для ускоренной биохимической идентификации предложен набор СИБ из 13 тестов (оксидаза, индол, лактоза, глюкоза, сахароза, манноза, арабиноза, маннит, инозит, аргинин, орнитин, лизин), дифференцирующий от представи-телей семейства Enterobacteriaceae, бактерии родов *Plesiomonas*, *Aeromonas* и др.

При выделении *Vibrio cholerae* группы, отличной от O1, возбудитель необходимо типировать с помощью других антисывороток. При выделении таких бактерий от больного с диареей обязательным считают проведение все-го объёма исследований для диагностики холеры.

**Лечение и профилактика.** Восполняют потерю жидкости и электроли-тов, проводят антибактериальную терапию препаратами тетрациклического ряда. Альтернативные антибактериальные препараты - левомицетин, ко-трамоксазол и фуразолидон. Профилактика холеры включает организацию санитарно-гигиенических мероприятий, предупреждающих занос заболевания; проведение санитарно-просветительной работы среди населения; раннее вы-явление больных и носителей: массовое профилактическое назначение тетра-циклинов в районах эпидемической опасности. Для специфической иммуно-профилактики разработаны

убитая вакцина из штаммов Огáва и Инáба, холе-роген-анатоксин для подкожного введения и бивалентная вакцина из анаток-сина О Ar Огáва и Инáба, Эффективность их использования не превышает 60-70 %, невосприимчивость сохраняется в течение 3-6 мес., поэтому вакцино-профилактику применяют по эпидемиологическим показаниям. В очагах холе-ры хороший эффект даёт профилактический приём тетрациклина.

## **СПЕЦИАЛЬНАЯ САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ** **САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ**

Вода водоемов содержит большое количество микроорганизмов, относящихся к автохтонной микрофлоре, а также попадающих в нее с осадками, сточными водами и другими загрязнениями – аллохтонных микроорганизмов. Количество и видовой состав микрофлоры воды и в значительной степени зависит от условий среды (наличие питательных веществ, температура, аэрация, окислительно-восстановительные условия, pH и др.; вещества, поступающие в водоем). Основным путем загрязнения водоемов является попадание неочищенных бытовых и промышленных отходов и сточных вод. Микрофлора сточных вод содержит обитателей кишечника человека и животных, включая представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры. Патогенные бактерии слабо приспособлены к существованию в воде, где на них оказывают неблагоприятное воздействие солнечные свет и различные другие факторы, включая конкурентную водную микрофлору, тем не менее, многие из них могут сохраняться в воде достаточно долго.

Регулярному санитарно-микробиологическому контролю подвергают:

- Воду питьевую: централизованного водоснабжения и местного с за-бором воды из открытых водоемов (реки, водохранилища) или из подземных источников (скважины, родники, колодцы).
  - Воду плавательных бассейнов; лед медицинский и хозяйственный.
  - Сточные воды: хозяйственно-фекальные, промышленные, смешанные (хозяйственно-фекальные и промышленные), талые и ливневые.

Нормирование качества вод проводят по следующим показателям:

- органолептическим (температура, запах, привкус, цветность, мутность);
- химическим (показатели химического состава);
- санитарным (ПАВ, БПК, ХПК, перманганатная окисляемость, аммоний, нитриты, нитраты);
- биологическим (микробиологическим, паразитологическим).

Все санитарно-микробиологические исследования воды регламентируются соответствующие нормативные документы. Основания для проведения санитарно-микробиологических исследований воды следующие:

- Выбор источника централизованного хозяйственно-питьевого водо-снабжения и периодический контроль над ним.
- Контроль эффективности обеззараживания питьевой воды централизованного водоснабжения.
- Наблюдение за подземными источниками централизованного водо-снабжения (артезианские скважины, почвенные воды и т.п.).
- Определение состояния и степени пригодности воды источников индивидуального водопользования (колодцев, родников и т.п.).
- Наблюдение за санитарно-эпидемиологическим состоянием воды открытых водоемов.
- Контроль эффективности обеззараживания воды плавательных бассейнов.
- Проверка качества и степени очистки сточных вод.
- Расследование водных вспышек инфекционных болезней.

Микрофлора и гигиеническая характеристика воды различна в зависимости от ее происхождения и использования. Для хозяйственно-питьевого водоснабжения можно

использовать межпластовые, грунтовые подземные воды, достаточно хорошо защищенные от микробного загрязнения фильтрующими слоями почвы (в артезианских скважинах в 1 мл воды содержатся единичные бактерии). Более широко для водоснабжения используют открытые поверхностные водоемы. Характер микрофлоры поверхностных водоемов зависит от особенностей конкретной водной среды. Микрофлору водоемов образуют 2 группы микроорганизмов: аутохтонные (водные) и аллохтонные (попадающие извне при загрязнении).

Аутохтонная микрофлора – совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде. Представителями аутохтонной микрофлоры воды являются *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, аэробные кокки: микрококки, сарцины, бактерии родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Leptospira*. Анаэробных микроорганизмов в незагрязненных водоемах мало; наиболее часто в них обнаруживаются клостридии. Количество микроорганизмов в открытых водоемах варьирует в широких пределах: от нескольких десятков, сотен до миллионов в 1 мл, что зависит от вида водоема, степени его загрязнения, гидрологического режима, смены метеорологических условий, сезона и др. В воде водоемов могут содержаться вещества, препятствующие размножению микроорганизмов и оказывающие на них губительное воздействие. Так, сероводород, образующийся в результате жизнедеятельности одних микроорганизмов, неблагоприятно влияет на другие. Кроме того, микрофлора водоемов зависит от видового состава и численности других организмов биоценоза. Так, находящиеся в воде фаги, хищные бактерии (бделловибрионы) и простейшие уничтожают миллионы бактерий. Микроорганизмы, способные образовывать антибиотики, вызывают гибель бактерий, чувствительных к этим веществам. На дне, в прибрежной зоне водоемов обнаруживают большое количество микробов, что связано с постоянным попаданием бактерий из почвы берега, с дождевой водой, с поверхностными стоками, поэтому флора любого поверхностного водоема периодически изменяется и обновляется. Вдали от берегов в воде содержится небольшое количество микроорганизмов.

Микроорганизмы воды играют значительную роль в круговороте веществ в природе. Они расщепляют органические вещества с образованием субстратов, которые используют в питании водные организмы. Биологическая активность в водоемах максимальна в летне-осенний период.

#### Аллохтонная микрофлора открытых водоемов

Воды поверхностных водоемов открыты для всех видов контаминации. Загрязнение их микроорганизмами, попадающими со сточными, ливневыми, тальми водами, резко изменяет микробный пейзаж и санитарный режим водоема. Основной путь микробного загрязнения – попадание неочищенных городских отходов и сточных вод в близлежащие озера, пруды, реки. При паводках, разливах рек, наводнениях или сильных ливнях возможно переполнение колодцев, родников и попадание в них сточных вод. Количество микроорганизмов в воде поверхностных стоков в период весеннего паводка увеличивается до 2,8-3,0 млн. в 1 мл. Микрофлора хозяйствственно-фекальных сточных вод состоит из микроорганизмов, выделяемых из кишечника человека и животных, среди которых имеются представители нормальной и условно-патогенной микрофлоры (эшерихии, энтерококки, клебсиеллы, клостридии, грибы рода *Candida*, простейшие и др.), но могут находиться и патогенные – возбудители кишечных инфекций (сальмонеллы, шигеллы, вибрионы, возбудители туляремии, иерсинии, лептоспирсы, вирусы полиомиелита, гепатитов А, Е и др.). опасность заражения последними особенно велика, если в водоемы попадают не-достаточно

очищенные и обеззараженные сточные воды инфекционных больниц. Контаминация воды водоемов происходит при купании людей, скота и др. Однако вода не являются благоприятной средой для размножения патогенных микроорганизмов, для которых естественные биотопы – организмы человека или животных. На жизнеспособность патогенных бактерий влияет сопутствующая конкурентная флора (микрофлора-антагонисты, фаги, простейшие, водоросли), а также температура, инсоляция, различные химические вещества и т.д.

Основной фактор самоочищения воды водоемов – конкурентная активация сапротрофной микрофлоры, которая приводит к быстрому разложению органических веществ, уменьшение численности бактерий различных видов, особенно фекального происхождения. Способность водоема к самоочищению связана с присутствием в ней аутохтонных микроорганизмов, входящих в конкрементный биоценоз. Однако количественные и качественные соотношения в биоценозах нестабильны и изменяются под действием различных факторов, т.е. изменяются по сапробности.

Сапробность (греч. *sapros* - гнилой) – комплекс особенностей водоема, в том числе состав и количество микроорганизмов в воде, содержащей органические неорганические вещества, в определенных концентрациях. Процессы самоочищения воды в водоемах происходят последовательно и непрерывно, с постепенной сменой биоценозов. Различают полисапробные, мезосапробные и олигосапробные зоны.

Полисапробные зоны (зоны сильного загрязнения). Содержат большое количество легко разлагающихся органических веществ и почти полностью лишены кислорода. Микробный биоценоз таких зон отличается повышенной численностью незначительных групп микроорганизмов (преимущественно анаэробных бактерий, грибов, актиномицетов). Количество бактерий в 1 мл воды полисапробной зоны достигает миллиона и более.

Мезосапробные зоны (зоны умеренного загрязнения). Характеризуются доминированием окислительных и нитрификационных процессов. Качественный состав разнообразен. В основном это нитрифицирующие, облигатно аэробные бактерии, а также виды *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Candida* и др. Общее количество микроорганизмов в 1 мл воды мезосапробной зоны – сотни тысяч.

Олигосапробные зоны (зоны чистой воды). Характеризуются окончанием процесса самоочищения, небольшим содержанием органических соединений и окончанием процесса минерализации. Воды отличаются высокой степенью чистоты. Количество бактерий от 10 до 1000 в 1 мл.

Патогенные микроорганизмы, попадающие в водоем, достаточно обильны в полисапробных зонах, постепенно отмирают в мезосапробных и практически не обнаруживаются в олигосапробных зонах.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды и выявлению патогенных микроорганизмов (сальмонелл, холерных вибрионов, лептоспир, шигелл, энтеровирусов). Последний анализ проводится по эпидемическим показателям. Кроме того, поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные методы, позволяющие дать количественную оценку степени фекального загрязнения воды (выявление БГКП, *E. coli*, энтерококков, стафилококков).

Исследованию подлежит вода: централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, сточные жидкости.

Особенности санитарно-микробиологического контроля воды

## открытых водоемов

В контроль над поверхностными водоемами входят исследование и за-ключе-ние о возможности использовать водоем (для питьевых, хозяйственных или других нужд), выяснение причин фекального загрязнения, определение способности водоема к самоочищению. Проводят определение ОМЧ, выделяют БГКП, кишечную палочку, энтерококки, стафилококки и патогенные микроор-ганизмы (сальмонеллы, холерные вибрионы, лептоспирсы, шигеллы и энtero-вирусы). Количество последних не должно превышать 100 в 1 л в зоне купания и не более 20 в 1 л воды бассейнов и морской воды. В последние годы разрабо-таны и предложены дополнительные критерии оценки состояния водоемов, в которые включены показатели титра энтерококков и *Clostridium perfringens*, а также индекс бактериофагов.

Согласно МУ по санитарно-биологическому анализу воды поверхност-ных водоемов № 2285-81 они включают основные и дополнительные показа-тели.

### Основные:

1) определение числа мезофильных сапротрофных аэробных и факуль-тативно анаэробных микроорганизмов, вырастающих при температуре 20-220С и 370С. соотношение численности этих групп микроорганизмов позволяет судить о динамике и интенсивности процесса самоочищения. При 20-220С вы-растает больше сапротрофных микроорганизмов, чем при 370С. Эта разница более выражена при завершении процесса самоочищения. В местах загрязне-ния хозяйственно-бытовыми сточными водами численные значения обеих групп близки. Сапротрофы, вырастающие при 20-220С, являются активными участниками процесса самоочищения водоемов. Динамика численности са-протрофов, вырастающих при 370С, является чувствительным индикатором загрязнения вод, в частности, органическими веществами;

2) определение ЛКП (или ОКБ).

### Дополнительные:

- определение числа бляшкообразующих единиц (БОЕ) фагов кишечных палочек. Определение числа БОЕ фагов кишечных палочек в воде осу-ществляется в том случае, если невозможно или затруднено проведение исследований на содержание кишечных вирусов;

- Для централизованного водоснабжения; при нецентральном питье-вом водоснабжении вода подлежит обеззараживанию.

- определение бактерий родов *Salmonella* и *Shigella*. Эти исследова-ния проводят при неблагоприятной санитарной и эпидемической обста-новке, а также при превышении нормативов по коли-индексу. Выделение из воды сальмонелл тифа, паратифов и шигелл свидетельствуют об эпиде-мической опасности данного водного объекта. В этом случае он не может служить источником водоснабжения и для рекреационных целей;

Таблица 8. Микробиологические показатели качества воды водных объектов в контрольных створах и в местах питьевого, хозяйственно-бытового и рекреационного водопользования (СанПиН 2.1.5.980-00).

№	Показатели	Категории водопользования	
		Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
1	Возбудители кишечных инфекций	Вода не должна содержать возбудителей кишечных инфекций	

2	Термотолерантные колiformные бактерии*	Не более, КОЕ/мл	
		100*	100
3	Общие колiformные бактерии*	Не более, КОЕ/мл	
		100*	100
4	Колифаги*	Не более, БОЕ/мл	
		10*	10

3) определение числа *Escherichia coli* (или ТКБ). Этот показатель определяют при оценке качества воды поверхностных водоемов для расшифровки характера и происхождения микробного загрязнения. Наличие в воде *E. coli* выше 1000 кл/л свидетельствует о недавнем поступлении хозяйствственно-фекального загрязнения, о незавершенных процессах самоочищения, о несоблюдении требований к очистке сточных вод. В этих случаях водоем предстает потенциальную эпидемическую опасность;

4) определение числа энтерококков. Энтерококки рекомендуется определять для подтверждения фекального загрязнения. При индексе энтерококков выше 500 предполагается поступление свежего фекального загрязнения и опасность в эпидемическом отношении;

5) определение числа стафилококков. Стапилококков определяют в воде водоемов, используемых для купания. Сигнальное значение для регламентации нагрузки на зону купания имеет наличие выше 100 стафилококков в 1 л воды;

6) определение холерного вибриона.

Особенности санитарно-микробиологического контроля качества питьевой воды

Санитарно-микробиологическое исследование питьевой воды включает определение ОМЧ, количества энтеробактерий, спор сульфатредуцирующих клостродий и колифагов (табл. 9).

Таблица 9. Микробиологические показатели качества питьевой воды (СанПиН 2.1.4.1074-01).

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колiformные бактерии	число бактерий в 100 мл	Отсутствие
Общие колiformные бактерии <1>	число бактерий в 100 мл	Отсутствие
Общее микробное число <1>	число образующих колоний бактерий в 1 мл	Не более 50
Колифаги <2>	Число БОЕ в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфатредуцирующих клостродий <3>	Число спор в 20 мл	Отсутствие

Примечания:

<1> превышение норматива не допускается в 95 % проб, отбираемых в точках водозабора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

<2> определение проводится только в системах водоснабжения из по-верхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

<3> определение проводится при оценке эффективности технологии обработки воды.

Определение ОМЧ при оценке качества питьевой воды. ОМЧ позволяет оценить уровень микробного загрязнения питьевой воды, дополняя пока-затели фекального загрязнения, и одновременно позволяет выявить загрязнение из других источников (например, промышленные сбросы). Увеличение ОМЧ (даже в пределах норматива), выявленное повторно служит сигналом для по-иска причины загрязнения. Также этот показатель незаменим для срочного обнаружения в питьевой воде массивного микробного загрязнения неизвестной природы. Из каждой анализируемой пробы должен быть сделан посев не ме-нее, чем на 2 чашки Петри объемом 1 мл. Через 24 ч проводят подсчет выросших колоний на обеих чашках, результаты суммируют и делят на два. Окончательные результаты выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды. В 1 мл питьевой воды должно быть не более 50 КОЕ.

Определение количества энтеробактерий. При проведении исследова-ний не ограничиваются определением БГКП, но и используют более широкое понятие – бактерии семейства Enterobacteriaceae и термотолерантные коли-формные бактерии.

• Бактерии семейства Enterobacteriaceae включают грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, растущие на сре-дах с лактозой (Эндо) и ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при тем-пературе 370С в течение 24 ч. Обнаружение в питьевой воде бактерий семейства Enterobacteriaceae указывает на потенциальную эпидемическую опас-ность водопользования. Показатель «бактерии семейства Enterobacteriaceae» - основной нормируемый показатель, обеспечивающий наиболее надежный контроль присутствия в воде практически всех представителей кишечных бак-терий.

• Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми призна-ками бактерий семейства Enterobacteriaceae, и, кроме того, ферментируют лак-тозу с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 44 0С в тече-ние 24 ч. Термотолерантность быстро утрачивается, поэтому обнаружение бактерий с таким свойством свидетельствует о недавнем попадании в воду ки-шечных бактерий (свежее фекальное загрязнение).

Численное выражение результата анализа характеризует степень фе-кального загрязнения воды. Бактерии семейства Enterobacteriaceae и термо-толерантные колиформные бактерии должны отсутствовать в 300 мл пить-евой воды.

Выявление спор сульфитредуцирующих кло-стридий. Споры сульфи-тредуцирующих кло-стридий более устойчивы к обеззараживанию и действию неблагоприятных факторов окружающей среды, чем другие индикаторные бактерии. На основании этого свойства показатель рекомендован для оценки эффективности технологических процессов очистки воды. Особое значение этот показатель имеет при оценке первичного хлорирования, так как оно инак-тивирует практически все индикаторные бактерии. Обнаружение кло-стридий в воде перед поступлением в распределительную сеть указывает на недостаточ-ную очистку и на то, что устойчивые к обеззараживанию патогенные микроор-ганизмы, вероятно, не погибли при очистке. Споры сульфитредуцирующих кло-стридий должны отсутствовать в 20 мл исследуемой питьевой воды.

Определение количества колифагов. Наиболее часто содержание ко-лифагов в питьевой воде определяют титрационным методом, включающим предварительное подращивание их в среде обогащения (культура Escherichia coli на питательном агаре) с

последующим выявлением бляшек колифага на газоне *E. coli*. В 100 мл исследуемой питьевой воды должны отсутствовать бляшкообразующие единицы (БОЕ) колифагов.

#### Санитарно-бактериологическое исследование воды плавательных бассейнов

Контроль воды плавательных бассейнов имеет особое значение, т.к. че-рез воду передаются возбудители многих грибковых, вирусных, бактериаль-ных и паразитарных заболеваний. Санитарные требования к проектированию, строительству и режиму эксплуатации плавательных бассейнов, качеству по-ступающей и содержащейся в них воды и ее обеззараживанию, а также к убор-ке и дезинфекции помещений установлены в СанПиН 2.1.2.568-96 «Гигиениче-ские требования к устройству, эксплуатации и качеству воды плавательных бассейнов».

- Пресная вода, поступающая в бассейн, должна отвечать гигиениче-ским требованиям, предъявляемым к качеству воды централизованных систем водоснабжения (табл. 10).

- Морская вода в системах водозабора должна содержать колиформ-ные бактерии в количестве не более 1000 КОЕ в литре. В процессе эксплуатации бассейна, как с пресной водой, так и с морской, она должна соотвествовать следующим требованиям:

- В 100 мл воды должны отсутствовать бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, термотolerантные колиформные бактерии, лецитиназположи-тельные стафилококки, а также любые возбудители инфекционных заболева-ний человека.

В 100 мл воды допускается наличие не более 2-х БОЕ колифагов. В про-цессе эксплуатации бассейна вода, находящаяся в ванне бассейна, должна соответствовать требованиям, указанным в таблице 10.

При производственном контроле основные микробиологические показа-тели определяют один раз в 10 дней. Отбор проб воды на анализ проводят не менее, чем в двух точках с расстояния 25-30 см от поверхности воды; забор проводят в мелкой и глубокой частях бассейна. При лабораторном контроле основные микробиологические показатели определяют один раз в месяц. Про-бы отбирают из бассейна в точках, указанных выше, а также отбирают пробы воды, поступающей на водные фильтры и после них (для бассейнов с морской водой). Отбор проб проводят в емкости в объеме 1 л, с соблюдением правил стерильности.

Таблица 10. Микробиологические показатели и нормативы каче-ства воды в ванне бассейна (СанПиН 2.1.2.568-96).

Показатели	Нормативы
Колиформные бактерии в 100 мл	не должны обнаруживаться
Термотolerантные колиформные бактерии в 100 мл	не должны обнаруживаться
Колифаги в 100 мл, не более	2
Лецитиназположительные* стафилококки	не должны обнаруживаться
Дополнительные микробиологические и паразитологические показатели	
Возбудители инфекционных заболеваний в 1000 мл	не должны обнаруживаться
Синегнойные палочки в 1000 мл	не должны обнаруживаться
Цисты лямблий в 50 мл	не должны обнаруживаться
Яйца и личинки гельминтов в 50 мл	не должны обнаруживаться

\*Лецитиназа – фермент, разрушающий клеточные мембранны.

#### Санитарно-бактериологическое исследование сточных вод

Основная задача санитарно-микробиологического исследования сточных вод – проверка эффективности и обеззараживания сточных вод и их осад-ков перед спуском в водоемы и на поля орошения. В ряде случаев исследуют сточные воды неочищенные или на этапах очистки до хлорирования для контроля работы очистных сооружений на наличие только лактозоположительных колиформных бактерий, а после хлорирования определяют бактерии семейства Enterobacteriaceae как в питьевой воде.

Традиционный санитарно-бактериологический анализ на сооружениях биологической очистки включает учет сапротрофных бактерий, растущих на стандартных питательных средах, и определение группы кишечной палочки, что в совокупности характеризует бактериологическое микробное загрязнение очищаемой воды.

При контроле процесса очистки микробиологический анализ предполагает определение общей численности и морфологического разнообразия бактерий внутри хлопьев активного ила, поскольку бактерии активного ила являются важнейшим компонентом биоценоза, играя ключевую роль в трансформации органического вещества.

В то же время, бактерии внутри хлопьев ила практически учитываются довольно редко и, в основном, на очистных сооружениях для характеристики санитарного качества воды определяются сапротрофные виды санитарно-бактериологическим методом посева на питательные среды продолжительностью от 24 до 72 и более часов.

Таблица 11. Микробиологические и паразитологические показатели качества сточных вод, используемых для орошения (СанПиН 2.1.7.573-96).

Показатели	Допустимое содержание в 1 дм <sup>3</sup>
Число ЛПК (лактозоположительные кишечные палочки)	<1000
Патогенные микроорганизмы (определение проводится по эпидпоказаниям)	Нет
Жизнеспособные цисты кишечных простейших (дизентерийная амеба, лямблии)	<1
Жизнеспособные яйца гельминтов (аскариды, власоглав, остирицы, токсакар, фасциолы, тениид, карликового цепня)	<1

При использовании сточных вод для орошения сельскохозяйственных полей предъявляются особые требования. Показатели микробиологического и паразитологического контроля приведены в таблице 11.

#### САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

Почва представляет собой наиболее насыщенный микроорганизмами биотоп, отличающийся стабильностью состава микрофлоры. На формирование микробных почвенных биоценозов, имеющих, в том числе и санитарное значение, на их качественный и количественный состав влияет множество факторов.

Тип почвы и степень ее окультуренности. Чем она выше, тем больше общая микробная обсемененность. Соответственно, исходный «нормальный» показатель ОМЧ для разных почв различен (табл. 12).

Физико-химические свойства почв: структурированность, аэрация, влажность, водопроницаемость, наличие свободного и связанного кислорода.

Возраст, географическое расположение почвы. В направлении с юга на север содержание органических веществ в ней, а соответственно, и микро-организмов уменьшается.

Климатические условия и сезонность. Весной в почве преобладают анаэробные, летом – спорообразующие бактерии. К концу лета увеличивается содержание актиномицетов, усваивающих органические вещества, не утилизи-рованные бактериями. Биологическая активность всех почвенных микроорганизмов увеличивается осенью и заметно снижается в зимний период.

Таблица 12. Численность отдельных групп микроорганизмов в разных почвах (Мищустин и др., 1979).

Почва	Состояние	Общая численность, $10^8$ кл/г	Численность сапротрофов, $10^6$ кл/г	Титр нитрификаторов
Подзолистые и дерново-подзолистые	целинные	0,6-1,0	1,1	Выше 0,01
	окультуренные	10-20	2,6	0,01
	огородные	-	5,3	0,001
Черноземы	целинные	20-25	3,6	0,01
	окультуренные	25-30	4,5	0,001

Глубина почвенного слоя. В толще почвы выделяют три основных горизонта: А (0-10 см), В (10-20 см), С (20-30 см). На поверхности и в горизонте А микроорганизмов мало вследствие низкой влажности и микробиоцидного действия прямого солнечного света. В необработанной почве горизонта А их содержание наиболее велико на глубине 5-10 см (в зоне, пограничной с горизонтом В). В обработанной почве микроорганизмов особенно много на границе горизонтов В и С. На глубине 1 м выделяют единичные микроорганизмы. Виды, выделяемые на глубине 4 м более, рассматривают не как почвенные, а как имеющее геологическое значение.

#### Группы почвенных микроорганизмов

Почвенные микроорганизмы оказывают непосредственное влияние на собственно образование и формирование почвы, на минерализацию (разложение) органических остатков и образование гумуса. Поэтому, не имея представления об основных экологических, физиологических, морфологических группах почвенной микрофлоры невозможно объективно оценить санитарное состояние почвы, активность процессов ее самоочищения от патогенных микроорганизмов.

Физиологические группы почвенных микроорганизмов включают виды, участвующие в круговороте азота, углерода, серы и фосфора. Однако для полномасштабной оценки санитарного состояния почвы и процессов ее самоочищения необходимо определять наличие не только видов, участвующих в круговороте веществ: спорообразующих бактерий (прежде всего бацилл), актиномицетов, грибов (в первую очередь пенициллов и кандид).

Группы почвенных микроорганизмов, патогенные для человека. В почве патогенные микроорганизмы длительно не выживают. Однако некоторые виды включаются в почвенные биоценозы, становясь ее постоянными обитателями. Подобные микроорганизмы разделяют на три группы.

- Микроорганизмы, для которых почва служит природным биотопом – *Clostridium botulinum* - возбудитель ботулизма (от лат. *botulus* - колбаса), актиномицеты, возбудители глубоких микозов, образующие микотоксины ас-пергилы.

- Микроорганизмы, попадающие в почву с выделениями человека, животных и сохраняющиеся там длительное время (годами и десятилетиями) – *Bacillus anthracis* - сибириеязвенная палочка, *Clostridium tetani* - возбудитель столбняка, *Clostridium perfringens*. *C. novyi*. *C. septicum* - газовой гангрены (от греч. *gangraina* – разъедающая язва).

- Микроорганизмы, попадающие в почву с выделениями человека, животных, но сохраняющиеся в ней сравнительно недолго (недели и месяцы) – *Escherichia coli* - кишечная палочка (до 8 мес.), *Salmonella* - сальмонеллы (до года при минусовой температуре), *Shigella* - шигеллы (до 100 дней), *Vibrio cholerae* - холерный вибрион (2 мес.), *Mycobacterium*, *Leptospira*, *Pseudomonas*, *Francisella*, энтеровирусы, вирус ящура.

Индикаторные микроорганизмы для оценки санитарного состояния почв

Осуществление санитарного надзора за состоянием почвы населенных мест имеет важное значение в профилактике кишечных инфекций и других за-болеваний. Поэтому для адекватной оценки почвы особую значимость имеет выбор индикаторных микроорганизмов. К СПМ, указывающим на фекальное загрязнение почвы относят (табл. 13):

- БГКП;
- *Clostridium perfringens*;
- термофильные бактерии;
- нитрифицирующие бактерии.

Таблица 13. Показатели чистоты почв по санитарно-показательным микроорганизмам.

Категории почвы	Титры кишечной палочки	Титры нитрифицирующих бактерий	Титры <i>Clostridium perfringens</i>	Количество термофильных бактерий (в 1 г)
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	100-1000
Загрязненная	0,9-0,01	0,01-0,001	0,009-0,0001	1001-100 000
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,0001 и ниже	0,00009	10 001-4 млн.

Из всех энтеробактерий наиболее долго сохраняется в почве кишечная палочка, поэтому по ее содержанию судят о наличии в почве прочих энте-робактерий. Термофильные бактерии попадают в почву с перегревшим наво-зом или компостом, поэтому их целесообразно выявлять для выяснения харак-тера и давности органического загрязнения почвы. Свежий навоз, сточные во-ды обычно содержат много БГКП, но мало термофильных бактерий. По мере разложения органических веществ количество термофилов увеличивается. По-явление нитрифицирующих бактерий (нитрификаторов) указывает на развитие процессов самоочищения, так как они завершают цикл разложения азотсодер-жащих соединений, превращая аммиак в азот. При свежем фекальном загрязнении нитрификаторов не будет, поскольку субстрат для их развития отсут-ствует. В ходе жизнедеятельности микроорганизмов, разлагающих органиче-ские вещества, образуется аммиак, что приведет к развитию нитрификации.

- На свежее фекальное загрязнение почвы указывают высокие титры БГКП при низких титрах нитрификаторов, термофилов. А также относительно высокое содержание вегетативных форм *Clostridium perfringens*.

- Обнаружение энтерококков всегда свидетельствует о свежем фе-кальном загрязнении, каковы бы ни были другие показатели

- Большое содержание всех СПМ свидетельствует об окончании самоочищении почвы и ее освобождения от патогенных энтеробактерий и органических веществ.

Цели санитарно-микробиологического исследования почвы

Цели санитарно-микробиологического исследования почвы следующие:

- Санитарная оценка почвы населенных пунктов и новых участков для заселения, размещения санаториев, детских лагерей, дошкольных учреждений, водохранилищ и т.д.
- Решение вопросов водоснабжения, канализации, очистки населенных пунктов.
- Санитарная оценка почвы, загрязненной химическими веществами.
- Контроль процессов самоочищения почвы, подвергшейся биологическому загрязнению.
- Эпидемиологическое обследование почвы для выяснения путей ее заражения.

Проводят индикацию и идентификацию патогенных микроорганизмов, в загрязнении которых почва играет значительную роль – сальмонелл, шигелл, патогенных клоstrидий и палочек сибирской язвы.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы в зависимости от целей исследований предполагает краткий и полный анализ. Отбор проб производится с квадратного участка (не менее 5x5 м). Образцы отбирают с глубины 20-30 см из каждого угла и центра квадрата. Объем образцов 1 кг.

Краткий санитарно-микробиологический анализ предусматривает определение ОМЧ, титров БГКП, энтерококков, *Clostridium perfringens*, термо-фильных бактерий, нитрифицирующих бактерий. Полученные показатели указывают на наличие и степень фекального загрязнения. Это позволяет определить состояние процессов самоочищения почвы от патогенных энтеробактерий и органического загрязнения. Краткий анализ почвы осуществляется при проведении текущего санитарного надзора за состоянием почвы.

Полный санитарно-микробиологический анализ включает определение всех показателей краткого анализа, а также общей численности сапрофитов; ОМЧ и процентное содержание споровых микроорганизмов; аэробных бактерий, разрушающих клетчатку; бактерий-аммонификаторов. Кроме того, исследуют токсичность почв для микроорганизмов. Полный анализ проводят при осуществлении предупредительного санитарного надзора, первичном обследовании при выборе территории для размещения отдельных объектов и др.

**Периодичность контроля.** Для контроля загрязнения почвы детских садов, ЛПУ, зон отдыха отбор проб проводят не менее 2-х раз в год – весной и осенью. На других контролируемых объектах анализ почвы проводят с периодичностью, регламентированной нормативами, но не реже одного раза в год. При изучении динамики самоочищения почвы на загрязненных территориях пробы берут в течение первого месяца после предшествующего загрязнения – еженедельно, в последующие месяцы – один раз в месяц в течение вегетационного периода до завершения активной фазы самоочищения.

Санитарно-микробиологическая оценка качества почвы является важным звеном при осуществлении предупредительного и текущего санитарного надзора за качеством почв.

Предупредительный надзор осуществляется:

- 1) при планировке, строительстве и реконструкции вновь заселяемых участков и населенных мест;
- 2) при выборе участков для строительства детских дошкольных учреждений, санаториев, мест отдыха и т.п.;
- 3) при строительстве водохранилищ;

- 4) при решении вопросов водоснабжения и канализации;
- 5) при оценке качества почв на полях орошения, и т.п.

Текущий санитарный надзор осуществляется:

- 1) при оценке степени биологической контаминации почвы и ее способности к самоочищению;
- 2) при контроле за почвенными и биотермическими методами обеззараживания сточных вод;
- 3) по эпидемическим показаниям для выяснения возможных путей передачи возбудителей инфекционных заболеваний через почву.

Требования к качеству почв населенных мест и сельскохозяйственных угодий при размещении, проектировании, строительстве, реконструкции (техническом перевооружении) и эксплуатации объектов различного назначения устанавливают санитарные правила СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы».

Оценку санитарного состояния почв проводят с учетом комплекса показателей: санитарно-химических, санитарно-бактериологических, санитарно-паразитологических, санитарно-энтомологических.

Отбор, транспортирование, хранение, подготовка к анализу и анализ проб осуществляется в соответствии с утвержденными нормативными документами:

- ГОСТ 17.4.4.02-84 «Методы отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа»;
- МУ 2.1.7.730-99 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и производственные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест»;
- МУ по санитарно-микробиологическому исследованию почвы № 2293-81. Утв. МЗ СССР 19.02.81.

Программа обследования почвы определяется в каждом конкретном случае с учетом:

- целей и задач исследований;
- характера землепользования;

специфики источников загрязнения, определяющих характер (состав и уровень) загрязнения изучаемой территории (табл. 14).

Результаты оцениваются в соответствие с показателями, приведенными в таблице 15.

На объектах повышенного риска оценка санитарного состояния почвы проводится на основании результатов анализов почв по следующим санитарно-бактериологическим показателям:

1. Косвенные, характеризующие интенсивность биологической нагрузки на почву.

Это санитарно-показательные организмы группы кишечной палочки: БГКП (коли-индекс) и фекальные стрептококки (индекс-энтерококков).

2. Прямые санитарно-бактериологические показатели эпидемической опасности почвы.

Это обнаружение возбудителей кишечных инфекций, патогенных энте-робактерий, энтеровирусов.

Основными интегральными показателями биологической активности почвы являются:

- общая микробная численность (ОМЧ);

Таблица 14. Некоторые показатели оценки санитарного состояния почв населенных мест в зависимости от их функционального назначения (СанПиН 2.1.7.1287-03).

№	Наименование показателя	Объекты наблюдения (функциональные зоны, территории)						
		Жилая зона	Детские дошкольные и школьные учреждения, игровые площадки, территории дворов	Зоны санитарной охраны водоемов	Рекреационные зоны (скверы, парки, бульвары, пляжи, лесопарки)	Транс-портные магистрали	Промышленная зона	Почвы с/х (опытные поля, сады и огорода, приусадебные участки, теплицы)
1	Санитарное число (отношение белкового азота к общему органическому азоту)	+-	+-	+-	-	-	-	-
2	pH	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-
3	Лактозо-положительные палочки (колиформы), индекс*	+	+	+	+	+	+	+
4	Энтерококки (фекальные стрептококки), индекс	+	+	+	+	+	+	+
5	Патогенные микроорганизмы (по эпид-показаниям), индекс	+	+	+	+	+	+	+

Примечания:

\* - допускается определение фекальных форм;

«+» - показатель обязательный при оценке санитарного состояния почв;

«-» - показатель необязательный;

«+-» - показатель обязательный при наличии источника загрязнения.

Таблица 15. Оценка степени биологического загрязнения почвы (СанПиН 2.1.7.1287-03).

Объекты	Категория загрязнения	Показатели, кл/г			
		Кишечные палочки	Энтеробактерии	Патогенные энтеробактерии	Энтеровирусы
<b>Зоны повышенного риска:</b> территории детских дошкольных и школьных учреждений, зон рекреации, огородов, выгульных площадок	Чистая	1-9	1-9	-	-
	Загрязненная	10 и выше	10 и выше	+	+

<b>Зоны санитарной охраны водоемов</b>	Чистая	1-9	1-9	1-9	-
	Загрязненная	10 и выше	10 и выше	10 и выше	+
<b>Санитарно-защитные зоны</b>	Чистая	1-99	1-99	-	-
	Загрязненная	100 и выше	100 и выше	+	+

Примечание: «-» - отсутствие в почве; «+» - наличие в почве.

- численность основных групп почвенных микроорганизмов (почвенных сапротрофных бактерий, актиномицетов, почвенных микромицетов);

- показатели интенсивности трансформации соединений углерода и азо-та в почве («дыхание» почвы, «санитарное число», динамика азота, аммиака и нитратов в почвах, азотфиксация, аммонификация, нитрификация и денитри-фикация);

- динамика кислотности и окислительно-восстановительного потенциала;

- активность ферментативных систем и другие показатели.

Перечень показателей определяется целями исследования, природой и интенсивностью загрязнения, характером землепользования. На первом этапе исследований целесообразно использование наиболее простых и быстро определяемых информативных и интегральных показателей: «дыхание» почвы, ОМЧ, окислительно-восстановительный потенциал и кислотность почв, динамика азота аммиака и нитратов.

Почву можно считать «незагрязненной» по показателям биологической активности при изменениях в микробиологических показателях не более 50 % и биохимических – не более 25 % по сравнению с такими же для контрольных, принятых в качестве чистых незагрязненных почв. Общее заключение о санитарном состоянии почв обследуемой территории дается на основании результатов проведенных комплексных исследований, в которых санитарно-бактериологический анализ является важнейшим звеном.

## САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА

Основная задача санитарно-микробиологического исследования воздуха – гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды. А также разработка комплекса мероприятий, направленных на профилактику аэробен-ной передачи возбудителей инфекционных болезней. При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяют ОМЧ, наличие СМ (стафилококков, а- и β-гемолитических стрептококков, являющихся показателями контаминации микрофлорой носоглотки человека). В связи с развитием биотехнологической промышленности, использующей различные микроорганизмы-продуценты БАВ, существенно возрос риск выброса в атмосферу больших концентраций микробов, в том числе с измененным генотипом. При этом, технология производства некоторых веществ прямо включает периодический «выпуск» микроорганизмов. Все это придает проблеме контроля за микрофлорой воздуха и обеззараживанием выбросов биотехнологических предприятий особую актуальность.

### Микрофлора воздуха

Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный и локальный характер, т.е. микрофлора воздуха зависит от места и времени отбора проб. Летом обсемененность воздуха в несколько раз выше, чем зимой. Особенно насыщен атмосферный воздух микроорганизмами над крупными городами. При рассмотрении качественного состава микрофлоры воздуха особенно следует различать микрофлору атмосферного воздуха и воздуха жилых помещений.

Атмосферный воздух закрытых помещений значительно отличается по количественному и качественному составу микроорганизмов. Бактериальная обсемененность жилых помещений выше плотности бактерий в атмосферном воздухе, в том числе и патогенными видами, попадающими в воздух от больных людей и животных (капельным путем в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чихании, со слущивающимся эпителием кожных и шерстных покровов, с пылью загрязненного постельного белья и зараженной почвы).

Микрофлора атмосферного воздуха. В атмосферном воздухе СПМ (стафилококки и стрептококки) обнаруживают лишь в 3,7 % проб, взятых в местах большого скопления людей. Среди микроорганизмов доминируют виды, обитающие в почве. В атмосферном воздухе в основном встречают три группы микроорганизмов:

- Пигментообразующие кокки в солнечные дни составляют 70-80 % всей флоры (пигмент защищает бактерии от инсоляции).
- Почвенные споровые и гнилостные микроорганизмы. Их содержание резко увеличивается в сухую и ветреную погоду.
- Плесневые грибы и дрожжи. Их содержание увеличивается при повышении влажности атмосферного воздуха.

Обычно из воздуха выделяют представителей *Micrococcus*, *Bacillus sub-tilis*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. mesentericus*, различные виды *Actinomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.

В отличие от воздуха закрытых помещений, в атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самоочищения. Этот процесс происходит благодаря осадкам, инсоляции, температурным воздействиям и другим факторам. В свою очередь атмосферный воздух сам по себе – фактор очищения воздуха жилых помещений.

Микрофлоры воздуха закрытых помещений более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носо-глотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. Основной источник загрязнения воздуха патогенными видами – бактерионосители. Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязненности, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижает обсемененность воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). Самоочищения воздуха закрытых посещений не происходит

Задачами санитарно-микробиологического исследования воздуха являются:

- гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды;
- разработка комплекса мероприятий, направленных на профилактику аэрогенной передачи возбудителей инфекционных болезней.

Исследование воздуха закрытых помещений проводится в медицинских, детских, культурных учреждениях, различных предприятиях. Разработка нормативов по бактериальной обсемененности воздушной среды представляет большие трудности, т.к. воздух – среда очень динамичная и его санитарно-микробиологическое состояние зависит от многих факторов.

Для лечебных учреждений в зависимости от их функционального назначения уровень бактериальной обсемененности воздушной среды регламентируется в соответствии с СанПиН 2.1.3.1375-03 «Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров» (табл. 16).

Важным объектом контроля за бактериальной обсемененностью воздуха являются парикмахерские (СанПиН 2.1.2.1199-03 «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию»). При оценке санитарного состояния воздуха руководствуются следующими нормами: в 1 м<sup>3</sup> воздуха общее количество колоний микроорганизмов не должно превышать 1 500, количество золотистого стафилококка – до 100, количество плесневых и дрожжевых грибов – до 20.

Для обеззараживания воздуха в учреждениях различного профиля (лечебных, парикмахерских, организациях пищевой промышленности и др.) должно применяться ультрафиолетовое бактерицидное облучение.

Эффективность УФ-облучения помещений (бактерицидная эффективность) оценивается по степени микробной обсемененности воздуха, поверхностей, ограждений и оборудования до и после облучения и выражается в процентах. Значение показателя бактерицидной эффективности устанавливается в зависимости от категории помещения.

Основные требования к нему и методика определения микробной обсемененности изложены в следующих документах:

- Руководство Р 3.1.683-98 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздушной среды помещений организаций пищевой промышленности, общественного питания и торговли продовольственными товарами».
- МУ 2.3.975-03 «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию».

Таблица 16. Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды помещений лечебных учреждений (СанПиН 2.1.3.1375-03).

Класс чистоты	Помещение	Санитарно-микробиологические показатели					
		Общее микробное число, КОЕ/м <sup>3</sup>		Количество колоний <i>S. aureus</i> , КОЕ/м <sup>3</sup>		Количество плесневых грибов в 1 дм <sup>3</sup> воздуха	
		до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы
Особо чистые (А)	операционные, родильные залы, боксы для гематологических, ожоговых пациентов, палаты для недоношенных детей, боксы баклабораторий	не более 200		не должно быть		не должно быть	
Чистые (Б)	процедурные, перевязочные, палаты реанимации, детские палаты	не более 500		не должно быть		не должно быть	
Условно чистые (В)	палаты хирургических отделений, коридоры, примыкающие к операционным залам, ординаторские, смотровые боксы, кладовые чистого белья	не более 750	не более 1000	не должно быть	не более 2	не должно быть	
Грязные (Г)	коридоры и помещения административных зданий, лестничные марши, комнаты для грязного белья, санитарные комнаты, туалеты			не нормируется			

- СанПиН 2.1.2.1199-03 «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию».

Для примера в таблице 17 представлен необходимый уровень бактерицидной эффективности (по санитарно-показательному микроорганизму *S. aureus*) для различных помещений предприятий пищевой промышленности.

На предприятиях микробиологической промышленности, где в производстве используются в качестве продуцентов различные микроорганизмы, исследуют количественное и качественное содержание в воздухе микробов-продуцентов с целью предупреждения воздействия их на организм работающих людей (возможность заболевания и развития сенсабилизации). Сенсабилизация (лат. *sensibilis* - чувствительный) – повышение реактивной чувствительности организмов, их клеток и тканей.

Нормирование качества воздушной среды в этом случае осуществляется в соответствии с ГН 2.1.6.1041-01 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест». ПДК некоторых микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны приведены в таблице 18.

Для закрытых жилых и иных помещений, не рассмотренных выше, узаконенных нормативов по бактериальной обсемененности воздуха не существует.

Для оценки чистоты воздуха закрытых помещений рекомендуют ориентироваться на местные «нормативы», которые устанавливаются для каждого помещения после его тщательной уборки как среднее арифметическое не-скольких исследований. Полученные результаты принимаются за «норматив» для данного помещения.

Таблица 17. Необходимый уровень бактерицидной эффективности для санитарно-показательного микроорганизма *S. aureus* в помещения, подлежащих оборудованию УФ-облучателями для обеззараживания воздуха (МУ 2.3.975-00).

Категория	Тип помещения	Бактерицидная эффективность, %
I	Цеха по производству пищевых продуктов: колбас и колбасных изделий; мясных и рыбных изделий; консервирования рыбных, мясных, овощных и фруктовых изделий; молока и молочных продуктов при открытом технологическом процессе; кондитерских изделий; по приготовлению заквасок; полуфабрикатов; пивобезалкагольной продукции; мясных, рыбных и овощных полуфабрикатов; продуктов детского питания	99
II	Помещения фасовки готовых скоропортящихся продуктов	95
III	Помещения по переработке сырья; цеха по приготовлению горячих и холодных блюд; торговые залы предприятий общественного питания и торговли; мойки и хранения посуды	90
IV	Складские помещения с температурой воздуха не ниже 10 °C	85
V	Бытовые помещения	80

Санитарно-микробиологическому исследованию в последнее время все чаще подвергают воздух крупных животноводческих комплексов и птицефабрик, так как в нем могут присутствовать в больших количествах стафилококки, стрептококки, клостридии, бактерии кишечной группы, микроскопические грибы и др.

Во всех случаях, когда в воздухе жилых или производственных помещений обнаруживаются патогенные микроорганизмы, воздух считается загрязненным и эпидемически опасным.

В местах орошения земледельческих полей сточными водами методом дождевания проводят исследования с целью обнаружения сальмонелл, патогенных эшерихий. Такие исследования проводят по эпидемическим показаниям при появлении случаев заболевания среди персонала или населения.

Таблица 18. ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны.

Наименование микроорганизма-продуцента	Назначение	ПДК, кл/м <sup>3</sup>	Класс опасности
<i>Aspergillus awamori</i> 120/177	Продуцент глюкоамилазы	2 000	3
<i>Bacillus subtilis</i> 65	Продуцент нейтральной протеиназы и амилазы	40 000	4
<i>Bacillus subtilis</i> 72	Продуцент щелочной протеазы	50 000	4
<i>Bacillus subtilis</i> 103	Продуцент нейтральной протеазы	50 000	4
<i>Bacillus licheniformis</i> 1001	Продуцент бацитрацина	50 000	4
<i>Candida tropicalis</i>	Продуцент ксилита	300	3

Y-456			
<i>Penicillium canescens</i> F-832	Продуцент ксиланазы	2 00	3

### Условия циркуляции микроорганизмов в воздухе

Микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. Выделяют 3 основные фазы бактериального аэрозоля.

Капельная или крупноядерная (крупнокапельная) фаза состоит из бактериальных клеток, окруженных водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц около 0,1 мм и более. Частицы оседают довольно быстро: длительность пребывания в воздухе составляет несколько секунд, а скорость перемещения – в среднем 30 см/с.

Мелкоядерная (капельно-ядерная, мелкокапельная) фаза образуется при высыхании частиц первой фазы и состоит из бактериальных клеток, сохранивших только химически связанную воду на своей поверхности и свободную воду внутри клеток. В этой фазе частицы имеют наименьшие размеры, легко перемещаются потоками воздуха, длительное время находятся в нем во взвешенном состоянии. Это наиболее устойчивая фаза, так как диаметр большинства частиц не превышает 0,05 мм, а скорость оседания частиц составляет в среднем 0,013 см/с. При этом скорость их передвижения превышает 30 м/с, поэтому они могут рассеиваться на большие расстояния. Эта фаза представляет наибольшую эпидемиологическую опасность, так как в ее составе распространяется большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций, особенно малоустойчивых к внешним воздействиям.

Фаза «бактериальной пыли». Из первых двух фаз бактерии могут переходить в состав более крупных частиц, оседающих в виде пыли на различных предметах, образуя так называемую «бактериальную пыль». Ее важное свойство – способность легко диспергироваться под воздействием даже малых токов воздуха. Размер частиц варьирует от 0,001 до 1 мм. В зависимости от размера частиц и скорости воздушных течений, скорость их перемещения находится в пределах 0,5-30 см/с. Вследствие длительного пребывания во взвешенном состоянии и способности частиц проникать в дистальные отделы легких, мелкодисперсная «бактериальная пыль» также представляет эпидемиологическую опасность. Эта фаза бактериального аэрозоля преобладает в воздухе жилых помещений, и с ней рассеиваются патогенные микроорганизмы, устойчивые к высушиванию (микобактерии, клоstrидии, стафилококки, стрептококки, грибы).

Микроорганизмы воздуха чисто условно можно разделить на 2 группы:

- постоянные (по Н.Г. Холодному «истинно воздушные»), которые наиболее часто обнаруживаются в воздушной среде;
- переменные, находящиеся в воздухе не всегда и менее стойкие к воздействию различных факторов окружающей среды.

Постоянная микрофлора воздуха формируется за счет микроорганизмов почвы. К ней относятся различные пигментобразующие кокки, неспорообразующие и спорообразующие палочки, актиномицеты, грибы (*Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *Sarcina rosea*, *S. flava*, *Bacillus mycoides*, *Penicillium*). Благодаря содержанию каротиноидов эти микроорганизмы более устойчивы к воздействию солнечных лучей, что обеспечивает их способность сохраняться в воздухе.

Переменная микрофлора воздуха формируется при контаминации воздуха за счет:

- сапротрофных микроорганизмов воды и почвы, попадающих в воздух в ветреную погоду с пылью, капельками воды (*Micrococcus*, *Bacillus* и др.);
- нормальной микрофлоры человека и животных (*Staphylococcus*);
- патогенных микроорганизмов от больных людей и животных или бактерионосителей (например, *Mycobacterium tuberculosis*).

Методы выделения микроорганизмов из воздуха

Для выделения микроорганизмов из воздуха используют следующие методы.

Седиментационный метод (метод Коха). Обычно используют для установления состава микрофлоры в закрытых помещениях. Чашки Петри со средой раскладывают в различные места и открывают на определенное время: затем инкубируют и выявляют видовую принадлежность микроорганизмов. Чаще всего в воздухе определяют ОМЧ (применяют чашки с МПА: время экс-позиции 10-30 мин), содержание стафилококков (применяют чашки с желточно-солевым агаром (ЖСА): время экспозиции 15 мин), по эпидемическим пока-заниям определяют содержание стрептококков (применяют чашки с КА; время экспозиции 10-15 мин). При обследовании воздуха аптек производят определение содержания грибов, используя чашки со средой Сабуро. При спокойном состоянии воздуха на площадь 100 см<sup>2</sup> оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 0,01 м<sup>3</sup>.

Фильтрационный метод. Пропускают струю забранного воздуха через слой воды, затем проводят посев жидкости на различные среды, выделение и идентификацию микроорганизмов, попавших в воду.

Методы, основанные на принципе ударно-прибивного действия струи воздуха. Специальные аппараты (например, конструкции В.С. Киктенко, Л.М. Соколинского, Кротова и др.) позволяют точно определить количественное обсеменение воздуха конкретными микроорганизмами. Механизм улавли-вания микрофлоры основан на «ударно-пробивном» действии струи воздуха, который проходит через узкую щель и ударяется о влажную поверхность питательной среды. Во время отбора чашка Петри вращается вместе со столиком, чтобы обеспечивает равномерное распределение микроорганизмов по поверхности среды. Производительность такого прибора составляет 20-40 л/мин. Большое преимущество этого метода – возможность посева определен-ного объема воздуха.

## САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Пищевые продукты – самые сложные объекты в санитарной микробиологии. Это связано с разнообразием и обилием микрофлоры в пищевых продуктах, с использованием микроорганизмов в производстве многих продуктов и отсутствием полноценных методик выявления микробов. Через пищевые продукты могут передаваться возбудители многих инфекционных болезней – брюшного тифа, паратифов, сальмонеллезов, дизентерии, эшерихиозов, ботулизма, холеры, бруцеллеза, туберкулеза, сибирской язвы, вирусных инфекций (ящур, полиомиелит и др.). Пищевые токсикоинфекции, вызываемые стафилококками и условно-патогенными микроорганизмами, возникают после употребления в пищу зараженных пищевых продуктов. Обсеменение их микробами может происходить на всех этапах заготовки, хранения и приготовления. Пищевые продукты обычно невозможно полностью освободить от присутствия микроорганизмов без риска изменения их вкусовых качеств.

Наличие в пище большого количества разных факторов роста и витаминов способствует росту микроорганизмов. Этот факт является основным отличием изучения пищевых продуктов от прочих санитарно-микробиологических исследований, так как ни в воде, ни в почве, ни тем более в воздухе столь бурного развития микробов не происходит. При этом следует помнить, что естественная и безвредная для человека микрофлора пищи служит биологической защитой от нежелательных микроорганизмов (Поздеев, 2001). Как во всяком биоценозе, в ней могут доминировать те или иные виды, влияющие на качество пищевых продуктов. Представление о микрофлоре пищевых продуктов может дать качественное или количественное изучение ее популяции. При этом, роль конкретного микроорганизма необходимо оценивать не только всестороннего анализа биоценоза, но учитывать качество и характер исследуемых продуктов. Например, энтерококки можно рассматривать как признак фекального загрязнения, но их культуры применяют также при изготовлении некоторых продуктов (диетической простокваша, сыра «чеддер»). Таким образом, в продуктах питания различают специфическую и неспецифическую микрофлору.

Специфическая микрофлора пищевых продуктов представлена «культурными» микроорганизмами, используемыми для приготовления различных продуктов и являющими обязательным звеном в технологии их приготовления. Специфичные микроорганизмы используют в приготовлении всех кисломолочных продуктов, хлеба, пива, вина, в квашении овощей и т.д. При приготовлении кефира, простокваша, кумыса, творога, сметаны, масла используют *Lactococcus* (устар. *Streptococcus*) *lactis* (молочно-кислый стрептококк). В эти же продукты для получения сметанообразного состояния добавляют *Streptococcus cremoris* (сливочный стрептококк). Для заквашивания кефира используют так называемые кефирные зерна, состоящие из казеина, в котором находятся ассоциации микроорганизмов: молочно-кислые стрептококки, лактобациллы, молочные и дрожжеподобные грибы. Молочно-кислые кокки и палочки, гидролизуя лактозу, снабжают грибы кислотой, необходимой им для жизнедеятельности, а грибы, вызывая спиртовое брожение, насыщают продукт углекислотой, что придает кефиру особый вкус. В приготовлении некоторых кисломолочных продуктов (ацидофилина, кислого молока) используют *Lactobacillus acidophilus* (ацидофильная палочка). Контроль над чистотой этих культур и их сохранением осуществляют микробиологи лаборатории соответствующих предприятий пищевой промышленности.

Неспецифическая микрофлора пищевых продуктов включает микроорганизмы, случайно попадающие на пищевые продукты из окружающей среды. Ее составляют

сапрофиты, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, а также виды, вызывающие порчу пищевых продуктов. Во многих пищевых продуктах присутствует обильная сапрофитная микрофлора, вызывающая образование разнообразных биоценотических взаимосвязей. Присутствие некоторых сапрофитов способствует развитию биохимических процессов, закономерных для пищевого продукта, от которых зависит его качество и сохранность в результате антагонистического противодействия патогенным бактериям, попадающим в продукты. Степень загрязненности посторонней микрофлорой зависит от многих факторов: правильности заготовки сырья, его транспортировки, хранения, технологии обработки и соблюдения санитарного режима на всех этапах.

#### Санитарно-микробиологический анализ качества пищевых продуктов

Наиболее часто изучают два основных показателя – наличие, а также степень обсемененности продуктов микроорганизмами и наличие патогенных микроорганизмов. Выявление патогенов более точный вид анализа, но и более трудоемкий. Его используют лишь при первичной переработке мяса, при проведении некоторых анализов молока, мясных продуктов и контроле консервного производства. При этом преследуется 3 цели:

1. Контроль качества сырья, используемого в производстве пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий изготовления.
2. Контроль режимов хранения пищевых продуктов и оценка санитарно-гигиенических условий их транспортировки и реализации.
3. Контроль над обеспечением эпидемической безопасности пищевых продуктов.

При проведении исследований используют качественные и количественные методы. Качественными методами определяют характер технологической микрофлоры и возбудителей порчи продуктов. Количественными методами в сочетании с другими показателями определят сроки хранения и реализации продукции. Общее количество микроорганизмов исследуют в 1 г или 1 см<sup>3</sup> продукта методом кратных разведений. Конкретные виды определяют с использованием специфичных тестов.

На характер микробной обсемененности влияют физико-химические свойства продукта. Большинство микроорганизмов плохо выживают в продуктах с очень низкими или высокими показателями рН. Особенно обильно они размножаются в продуктах с жидкой и полужидкой консистенцией. В плотных, особенно сухих или порошкообразных продуктах, условия для размножения микробов затруднены и в них они располагаются «гнездами». На обсемененность пищевых продуктов влияют некоторые особенности технологии их производства и хранения:

- Механическая переработка (изготовление фарша, пюре и др.) увеличивает вероятность обсемененности и способствует гомогенному распространению микроорганизмов по всему продукту.
- Химическая обработка (соление, маринование) способствует резкому уменьшению числа микроорганизмов. Нередко соленые продукты дополнитель но коптят, что еще более снижает обсемененность.
- Температурный режим производства и хранения существенно влияет на рост микроорганизмов. Повышение температуры более неблагоприятно действует на микробов, чем понижение, поэтому действие высоких температур широко используется для обработки пищевых продуктов.

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям включают контроль над 4 группами микроорганизмов:

1) СПМ, к которым относятся мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы – МАФАНМ (КОЕ/г или см3 продукта) (ГОСТ 10444. 15-94) и бактерии группы кишечной палочки (БГКП) (ГОСТ Р 50474-93).

2) Условно-патогенные (потенциально-патогенные) микроорганизмы, к которым относят *E. coli*, *Staphylococcus aureus* (ГОСТ 30347-97); *Bacillus cereus*, сульфатредуцирующие клостридии, бактерии рода *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*.

3) Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы (ГОСТ Р 50480-93), *Listeria monocytogenes*.

4) Показатели микробиологической стабильности продукта – микроор-ганизмы, вызывающие порчу продуктов (дрожжи, плесневые грибы, молочно-кислые бактерии).

Микробиологические исследования пищевых продуктов проводят в со-ответствие с ГОСТами, санитарными правилами и нормами, методическими указаниями, инструкциями и другими нормативными документами.

Особое значение имеет санитарно-бактериологический контроль над производством консервов – пищевых продуктов, расфасованных в герметично укупоренную тару и консервированные тепловой обработкой или комбиниро-ванными методами. Консервное производство имеет целью создание пищевых продуктов, длительно сохраняющих высокие питательные свойства и одно-временно безопасные для здоровья потребителя. Пищевые продукты, подготавливаемые к изготовлению консервов, содержат самые различные по видо-вому составу и количеству микроорганизмы, происходящие из микрофлоры сырья и различных источников (тары, оборудования и пр.). Термовая стерилизация убивает микроорганизмы в консервируемом продукте, а герметичная укупорка банок исключает проникновение микроорганизмов внутрь. В большинстве случаев консервы изготавливают из продуктов, различных по качеству, и практически в каждой партии консервов часть банок оказывается не-стерильной.

Это обусловлено с тем, что среди множества микроорганизмов, учитывая термостойкость которых устанавливают режим стерилизации, встречаются и более термостойкие виды. Именно они составляют остаточную микрофлору консервов. Если спорообразующие микроорганизмы неустойчивы к нагреванию, то споры мезо- и термофильных бацилл и клостридий отличаются особой стойкостью к высоким температурам (115-1300С). Соблюдение заданных условий хранения консервов препятствует развитию ослабленной после стерилизации остаточной микрофлоры, и консервы остаются доброкачественными (промышленно-стерильными).

Таблица 19. Санитарно-бактериологические нормативы для молока и некоторых молочных продуктов (СанПиН 2.3.2.560-96).

Продукт	Микробное число* (КОЕ в 1 мл или 1 г), не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			Другие показатели
		БГКП (коли- формы)	патогенные, в том числе сальмо-неллы	<i>S. aureus</i>	
Молоко сырое (высший сорт)	$3 \times 10^5$	-	25	-	-
Молоко пастеризованное в бутылках и пакетах:					

- гр. А	$5 \times 10^5$	1,0	25	1,0	-
- гр. Б	$3 \times 10^5$	0,01	25	0,1	-
Молоко пастеризованное: - во флягах - в цистернах	$2 \times 10^5$ $3 \times 10^5$	0,01 0,01	25 25	- - -	- - -
Сливки пастеризованные в бутылках и пакетах	$1 \times 10^5$	0,1	25	1,0	-
Кисломолочные напитки (кефир, простокваша и пр.)	- наличие только микрофлоры закваски	0,01	25	1,0	-
Ряженка	-	1,0	25	1,0	-
Сметана	-	0,001	25	1,0	-
Сметана с термической обработкой	-	0,01	25	1,0	-
Творог и творожные изделия, вырабатываемые без термообработки	-	0,001	25	0,1	-
Десерты сливочные	-	0,01	25	0,1	-
Молоко сгущенное с сахаром	$2,5 \times 10^4$	1,0	25	-	-
Какао и кофе сгущенное с сахаром	$3,5 \times 10^4$	1,0	25	-	-
Сыры сычужные твёрдые и мягкие	-	0,001	25	<1000 КОЕ/г	-
Сыр Российский-	0,001	25		<500 КОЕ/г	-
Сыры плавленые без наполнителей с наполнителями (овощи, грибы и т.д.)	$5 \times 10^3$ $1 \times 10^4$	0,1 0,1	25 25	- -	Плесени, дрожжи <50 <50 <100 <100 (КОЕ/г)
Мороженое на молочной основе закаленное	$1 \times 10^5$	0,01	25	1,0	-
Мороженое мягкое из жидких смесей	$1 \times 10^5$	0,01	25	1,0	-
Мороженое мягкое из сухих смесей	$1 \times 10^5$	0,01	25	1,0	-

Масло сливочное вологодское	$1 \times 10^4$	0,1	25	Плесени, дрожжи, не более 200 КОЕ/г
сладко-сливочное и соленое любительское и крестьянское	$1 \times 10^5$	0,01	25	
кисло-сливочное любительское и крестьянское	-	0,01	25	
шоколадное	$1 \times 10^5$	0,01	25	
сливочное бутербродное	$5 \times 10^5$	0,001	25	
коровье топленое	$1 \times 10^3$	1,0	25	

\* допустимое количество микроорганизмов

Таблица 20. Некоторые санитарно-бактериологические нормативы для мяса, колбасных изделий и мясных продуктов

Продукт	Микробное число * (КОЕ в 1 мл или 1 г), не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			Другие показатели
		БГКП (коли-формы)	патогенные, в том числе сальмо-неллы	<i>S. aureus</i>	
Мясо замороженное (все виды убойных животных)	$1 \times 10^4$	0,01	25	-	-
Мясо в отрубах	$5 \times 10^5$	0,01	25	-	-
Телятина, свинина куском	$5 \times 10^6$	0,0001	25	-	-
Фарш говяжий	$5 \times 10^6$	0,0001	25	-	-
Колбасы с/к и с/к изделия из мяса убойных животных	-	0,1	25	1	Сульфит-восстановляющие клоストридии в 0,01 г не доп.
Колбасы п/к	-	1,0	25	1,0	Сульфит-восстановляющие клостродии в 0,01 г не доп.
Колбасные изделия вареные (колбасы, сардельки, сосиски) высший и 1-й сорта 2-й сорт	$1 \times 10^3$ $2,5 \times 10^3$	1,0	25	1,0	
Птица охлажденная и замороженная	$1 \times 10^5$	-	25	-	-

Среди остаточной микрофлоры консервов наиболее часто обнаруживаются:

- Мезофильные бациллы: группа *Bacillus subtilis* (B. subtilis, B. pumilus, B. licheniformis); группа *Bacillus cereus* (B. cereus, B. anthracis, B. megaterium, B. thuringiensis); группа *Bacillus polymixa* (B. polymixa, B. macerans, B. circulans).

- Бактерии рода *Lactobacillus*.
- Клостридии.
- Дрожжи.
- Плесневые грибы.

В зависимости от режима тепловой обработки и величины pH консерви-рованные продукты разделяют на группы: А, Б, В, Г, Е. Это деление позволяет проводить микробиологический контроль в определенном направлении. В зависимости от цели группы консервов исследуют на:

- промышленную стерильность;
- возбудителей порчи консервов;
- патогенную микрофлору по эпидемиологическим показаниям.

Особенности микробиологии рыбы, рыбопродуктов и промысловых беспозвоночных

Свежевыловленная рыба обсеменена микроорганизмами, количество которых зависит от ряда условий: сезона лова, температуры воды, глубины обитания рыбы, степени загрязнения воды, способа лова.

Количество микроорганизмов на поверхности свежевыловленной морской и пресноводной рыбы колеблется в пределах 102-107 клеток на 1 см<sup>2</sup>. Качественный состав микрофлоры, находящейся на поверхности рыбы, близок к микрофлоре воды. В рыбе, отловленной в холодных и умеренных регионах и в холодное время в любых широтах, преобладали представители психротрофных и психрофильных, бесспоровых, грамотрицательных бактерий, относящихся к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*. В теплое время года и в теплых водах поверхностная микрофлора кожных покровов рыб представлена мезофильной микрофлорой - различными видами микроплактов, коринебактерий. Многие из указанных бактерий обладают протеолитическими, жирорасщепляющими, кислотообразующими свойствами.

Особенно богаты микроорганизмами жабры. Жаберный аппарат, наполненный кровью, легко обсеменяется микрофлорой воды и природного ила.

Одним из основных источников обсеменения мяса рыбы является кишечник, количество микроорганизмов в нем может достигать 108 клеток в 1 г. Микрофлора кишечника более постоянная, в меньшей степени зависит от окружающей среды. В кишечнике свежей рыбы обнаружены представители родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aeromonas* и др.; в незначительном количестве - мицелиальные грибы, дрожжи, *E.coli*. В содержимом кишечника часто присутствуют спорообразующие анаэробные микроорганизмы: *Cl.sporogenes*, *Cl.perfringens*, *Cl.putrificus*.

Уровень обсемененности поверхности и внутренних органов речных и озерных рыб достигает 103-104 клеток на 1 см<sup>2</sup> и 106 в 1 г соответственно. Естественной микрофлорой этих рыб являются психрофильные бактерии родов *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*.

Особое значение имеет выделение из рыбы патогенных для человека микроорганизмов. В связи с неудовлетворительным санитарным состоянием прибрежных морских зон и внутренних водоемов из-за поступающих неочищенных сточных вод в них обнаруживают представителей бактерий группы кишечных палочек (в том числе

энтеропатогенных) родов *Salmonella*, *Schigella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Cl.botulinum* (особенно типа E). За последние два десятилетия в воде, а также на рыбе встречается *V.parahaemolyticis* - галофильный вибрион, возбудитель отравления.

Свежевыловленная рыба быстро погибает (засыпает). После гибели рыбы в ее теле происходит ряд сложных изменений: отделение слизи, окоченение, автолиз, микробиологические процессы. Отделение слизи рассматривается как реакция в момент агонии. Слизь состоит из глюкопротеида, муцина, свободных аминокислот, окиси триметиламина, других веществ и поэтому служит благоприятной средой для развития микроорганизмов. Посмертное окоченение рыбы выражается в сокращении и напряжении мышц. Тело рыбы становится твердым. Мышечная ткань здоровых рыб обычно считается стерильной. Посмертное окоченение затрудняет проникновение микроорганизмов внутрь мышечных тканей. Состояние посмертного окоченения, характеризующее свежесть рыбы, сменяется автолитическими и микробиологическими процессами, происходящими под влиянием ферментов самой рыбы и специфических микроорганизмов. Мышечные волокна отдают воду, размягчаются. Эти изменения способствуют проникновению микроорганизмов внутрь мышечных тканей. В тканях супой рыбы микроорганизмы проникают с поверхности, из кишечника, из крови жабр. Чем выше обсемененность, тем большее количество микроорганизмов будет в толще тканей.

Свежеуснувшая рыба начинает быстро портиться. Значительно изменяются органолептические показатели качества рыбы: тело теряет упругость, глаза впалые, жабры серые, усиливается ослизжение поверхности, слизь мутная, слегка разжиженная, ощущается неприятный запах. Основной причиной порчи являются расщепление микроорганизмами (*Pseudomonas* и в меньшей степени родов *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*) белковых и экс-трактивных веществ, гидролиз и окисление жира.

Общая обсемененность определяет потенциальную способность рыбы к хранению: чем она выше, тем быстрее снижается качество рыбы. Решающее значение при этом имеет преобладающая микрофлора. По мере увеличения бактериальной обсемененности гнилостными формами снижается сортность рыбы. Так, при анализе рыбы III сорта в 1 г ее тканей содержалось более 90 тыс. бактерий; из них 41% относились к гнилостным; в некондиционной рыбе насчитывалось около 350 тыс. бактерий, из которых более 50% составляла гнилостная микрофлора.

Характер и интенсивность процессов разложения белковых веществ рыбы определяются как составом микрофлоры, так и особенностями химического состава тела рыбы. Мясо морских рыб, содержащих большое количество экс-трактивных азотистых веществ, портится быстрее, чем пресноводных. В результате бактериального разложения белка образуются биогенные амины, в том числе гистамин, вызывающий неспецифические отравления. К микроорганизмам, образующим гистамин, относятся представители родов *Proteus*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *E.coli*. Пищевые продукты, в том числе и рыба, с содержанием свыше 300 мг/кг гистамина считаются непригодными в пищу.

Особенно на состояние водных организмов влияет загрязнение как морских, так и водных организмов (гидробионтов) ионами тяжелых металлов, радионуклидами, различными пестицидами, инсектицидами и др.

После отлова рыба попадает на борт рыболовного судна, где она перерабатывается и охлаждается. В процессе переработки рыбы ее подвергают мойке проточной морской водой. Такая промывка приводит к удалению слизи, в которой находятся бактерии, что сокращает количество поверхностной микрофлоры на 80-90 %. При разделке рыбу потрошат.

Потрошение рыбы связано с удалением кишечника. Мойка как целой, так и потрошеной рыбы приводит к уменьшению микроорганизмов, почти не отражаясь на их качественном составе.

Филетирование рыбы изменяет как количество микроорганизмов, так и их качественный состав. После разделки и мойки рыба должна иметь, по зарубежным данным, уровень обсеменения, не превышающий  $1 \times 10^4$  клеток в 1 г. На отечественных рыбообрабатывающих предприятиях допустимый предел общей бактериальной обсемененности сырья установлен на уровне  $5 \times 10^4$  клеток в 1 г (Ю. П. Пивоваров, Р. С. Волкова и др.). В качественном составе микрофлоры филе наблюдаются различия по сравнению с кожей и жабрами. Из воздуха, оборудования, рук обработчиков кроме бактерий рода *Pseudomonas* попадают различные виды рода *Micrococcus*, споровые аэробы, возрастает количество мезофильных микроорганизмов. Увеличение срока хранения свежей рыбы и получение высоких качественных готовых продуктов достигают охлаждением.

Охлажденная рыба. Для охлаждения рыбы на рыболовных судах используют лед. Применяемый лед по содержанию микроорганизмов должен отвечать требованиям, предъявляемым к питьевой воде. Температура рыбы, выдержанной подо льдом, несколько выше 0°C. При длительной транспортировке эта температура может повыситься до 6 °C.

Контакт рыбы со льдом приводит к существенному изменению количественного и качественного состава обсеменяющих ее микроорганизмов. Применение льда, приготовленного из чистой воды и не хранившегося длительное время в бункерах, не вызывает увеличения численности микрофлоры рыбы.

При соблюдении оптимальных условий хранения бактерии с наружных покровов проникают в мышечные ткани спустя 11-12 сут.

В процессе хранения свежевыловленной рыбы подо льдом уменьшается число мезофильных микроорганизмов и значительно возрастает содержание психрофильных бактерий - представителей *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*. После хранения рыбы подо льдом в течение 10 сут. бактерии этого рода составляют 50% всей микрофлоры, через 18 сут. – 96 %. Псевдомонады не только быстрее размножаются, но и обладают высокой биохимической активностью по отношению к белкам и жирам. Наиболее активны из них *Pseudomonas putrifaciens*, *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens* - продуценты H2S, NH3 и trimetilамина. Первые признаки изменений качества рыбы, вызываемых бактериями, наблюдаются при количестве их  $10^6$ - $10^7$  клеток на 1 см<sup>3</sup> поверхности. Появляется специфический неприятный запах, характерный для портящейся рыбы.

Недостаток способа хранения рыбы подо льдом - его быстрое загрязнение слизью, чешуей, что способствует и бактериальному загрязнению льда. Для повышения эффективности действия льда на микрофлору в него добавляют антибиотики: хлортетрациклин, хлорамфеникол, пенициллин, низин и др. Это дает возможность увеличивать срок хранения рыбы. Консерванты при этом должны быть абсолютно безвредными для человека и быстро разлагаться. Большинство же антибиотиков не отвечает указанным требованиям, т. е. не пригодно.

Хранение рыбы в холодильных камерах при низких температурах от 0 до +2°C не предотвращает развития психротрофных бактерий, их число спустя 10 сут. достигает  $10^7$  клеток в 1 г. Среди выделенных микроорганизмов преобладают протеолитические и липолитические формы родов *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*.

Размножение бактерий приводит к ухудшению качества, поэтому срок хранения охлажденной рыбы на предприятиях торговли и общественного питания при температуре от 0 до -2°C составляет 48 ч.

Для удобства потребителя и увеличения срока хранения используют механизированную фасовку рыбы в различные упаковочные материалы под вакуумом и без него. Микробиальная обсемененность рыбы, упакованной в воздухонепроницаемую полиамидную пленку под вакуумом, в 10 раз ниже, чем обсемененность рыбы в полиэтиленовой упаковке (как с вакуумом, так и без него) или рыбы, уложенной непосредственно в лед.

Хороший эффект в качестве дополнительного средства консервирования дает хранение в атмосфере азота. По данным А. И. Пискарева, срок хранения салаки при 0 °C в атмосфере, содержащей 98 % азота, на несколько суток пре-вышает срок хранения рыбы при той же температуре в обычной (воздушной) атмосфере. Дольше сохраняется рыба в модифицированной атмосфере с высоким (60-80 %) содержанием CO<sub>2</sub>.

Другим современным методом увеличения продолжительности сохранения качества рыбы является радиационная обработка ее у-излучением (радиация). По данным исследователей США, Индии, облучение до 2 кГр позволяет уменьшать количество микроорганизмов, увеличивать сроки хранения разделанной рыбы, и благодаря этому представляется возможным транспортировать ее в отдаленные районы страны. Наряду с уменьшением обсемененности значительно изменяется качественный состав микрофлоры. Перед облучением доминируют роды *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* и *Lactobacillus*. После облучения преобладают *Corynebacterium*, *Micrococcus* и *Bacillus*, многие из них обладают малой био-химической активностью и сравнительно невысокой скоростью размножения при низких положительных температурах.

Французскими учеными отмечено, что рыбное филе перед облучением целесообразно упаковывать под вакуумом. При температуре около 2°C облученные продукты в вакуумированной упаковке могли храниться без заметных признаков порчи в течение 21-30 сут., а срок хранения необлученного продукта, упакованного под вакуумом, не превышал 10 сут.

Для более длительного хранения рыбу замораживают или подвергают другим способам консервирования: посолу, копчению, маринованию, вялению,

Рыба мороженая. Она может длительно (месяцами) храниться без микробиальной порчи при температуре не выше -12°C. Хорошой защитой является покрытие глазурью и хранение рыбы при -18°C и относительной влажности, не превышающей 80 %.

В процессе замораживания многие микроорганизмы, находящиеся на рыбе, погибают. Обсемененность рыбы после замораживания колеблется от 102 до 103 в 1 г. При этом, чем выше обсемененность до замораживания, тем больше микроорганизмов сохраняется на мороженой рыбе.

Разные микроорганизмы проявляют неодинаковую устойчивость к губительному действию низких температур. Психрофильные бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, несмотря на их способность к росту при низких температурах, менее стойкие к замораживанию, чем бактерии рода *Flavobacterium*. Наименее устойчивостью к замораживанию обладают споры бактерий, микрококки, фекальные стрептококки.

В отношении влияния скорости замораживания на выживаемость микроорганизмов единого мнения не существует. Однако нередко наблюдается, что при температурах, близких к криоскопическим, быстрое замораживание продукта менее губительно для

микроорганизмов, чем медленное. Известно, что температурные пределы от -1 до -5-8°C, близкие к температурному мини-муму роста, наиболее неблагоприятны для микроорганизмов, поэтому при быстром прохождении этой зоны при замораживании клетки лучше сохраняются.

Гибель микроорганизмов в процессе замораживания и в замороженных продуктах происходит под влиянием многих неблагоприятных для них факторов. Однако эндоферменты, высвобождающиеся после автолиза бактериальных клеток, участвующие в гидролитических и окислительных процессах жира, сохраняют активность в замороженной рыбе в течение длительного времени.

На замороженной рыбе обнаруживаются преимущественно микрококки; палочковидные, не образующие спор бактерии, споры плесеней встречаются в небольших количествах.

В замороженном филе с повышенным уровнем бактериальной обсемененности, как правило, увеличивается процент обнаружения колiformных бактерий, энтерококков и клоstrидий.

Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, листерии, попадающие на рыбу, сохраняются при замораживании.

При размораживании, особенно медленном, некоторые микробы погибают, но сохранившиеся начинают быстро размножаться. Оттаявшая рыба портится быстрее. Поэтому размораживать продукт следует непосредственно перед использованием.

В нормативной документации нет нормативов по микробиологическим показателям для оценки качества свежей рыбы. Некоторые исследователи предлагают ограничить допустимое содержание сапрофитных бактерий в свежей, охлажденной и замороженной рыбе до 105 клеток в 1 г. В некоторых странах считается допустимым содержание бактерий в свежей охлажденной рыбе (2,5-5,0)×105 в 1 г, в свежей замороженной - 5,0×104, в свежезамороженном рыбном филе - (1,0-2,5)×105.

На предприятиях рыбоконсервных и по производству кулинарных изделий из рыбы допустимая общая бактериальная обсемененность свежей охлажденной или размороженной рыбы принимается 5×104 клеток в 1 г продукта, в 1 г фарша, приготовленного на производстве, - 1×105 клеток. Для быстрой санитарной оценки свежести рыбы рекомендуется бактериоскопическое исследование путем микроскопирования мазков-отпечатков с поверхности тела рыбы и из глубоких слоев мышц (табл. 21).

Рыба соленая. Посол - один из старинных способов хранения рыбы. Консервирующее действие посола обусловлено высокой осмотической активностью раствора соли и снижением водной активности среды. Поваренная соль не только тормозит размножение клеток, но и влияет на их биохимическую активность. Установлено, что при содержании соли до 4% возрастает протеолитическая активность микрококков, при 6%-ном содержании соли активность снижается, при 12%-ном - не обнаруживается. Аналогично влияет соль и на активность восстановления бактериями окиси триметиламина в три-метиламин.

Таблица 21. Оценка степени свежести рыбы при бактериоскопическом исследовании.

Степень свежести рыбы	В поле зрения микроскопа	
	поверхность рыбы	ткани мышц
Свежая	Единичные клетки (палочки и кокки)	Микроорганизмы должны отсутствовать
Задержанная в хранении, но пригодная для пищевого использования	10-30 клеток (палочки и кокки)	Единичные клетки

В настоящее время посолу подвергают главным образом виды рыб (сельдевые, лососевые), способные при выдержке в определенных условиях созревать, т.е. приобретать специфические вкусовые качества и более мягкую консистенцию в результате биохимических процессов превращения белков и липидов, происходящих в рыбе под влиянием ее собственных ферментов. Со-зревшая рыба съедобна без дополнительной кулинарной обработки. Некоторая роль в процессах созревания принадлежит и микроорганизмам, находящимся в тузлуке и на рыбе.

Несозревающие виды рыб солят для сохранения в качестве полуфабриката, используемого при изготовлении вяленой, сушено-копченой и других видов рыбной продукции.

При любом способе полоса рыбы происходят изменения количественно-го и качественного состава ее первоначальной микрофлоры. Типичные для свежей рыбы психротрофные виды *Pseudomonas* постепенно отмирают или сохраняются в небольшом количестве в плазмолизированном состоянии. Пре-обладающими в соленой рыбе и тузлухах становятся галофильные и соле-устойчивые микрококки; в меньшем количестве обнаружаются спороносные палочки; встречаются молочно-кислые бактерии, дрожжи, споры плесеней. Количество бактерий в тузлуке колеблется от 10<sup>3</sup> до 10<sup>6</sup> в 1 см<sup>3</sup>.

При хранении соленой рыбы возможно возникновение различных де-фектов. Некоторые из них обусловлены развитием микроорганизмов. Красные галофильные аэробные бактерии вызывают фуксин - красный слизистый налет с неприятным запахом. Кроме того, порчу соленой рыбы вызывают солеустойчивые микрококки, образующие красный пигмент, и галофильные коричневые плесени, которые, как и возбудители фуксина, попадают с солью. На поверхности рыбы, пораженной этими плесенями, появляются коричневые пятна и полосы, ощущается запах прогорклого жира. Этот дефект называется ржавле-нием. Коричневые плесени при температуре ниже 5°C не развиваются.

В целях предупреждения поражения рыбы фуксином и ржавлением следует проводить санитарно-микробиологический контроль соли, чтобы обнаружить присутствие возбудителей этих дефектов.

Слабосоленая сельдь может подвергаться под влиянием аэробных, холодно- и солеустойчивых бактерий омылению. При этом поверхность рыбы покрывается грязновато-белым мажущимся налетом. Рыба приобретает неприятный вкус и гнилостный запах. В соленой сельди могут выживать и токсигенные бактерии: сальмонеллы, золотистый стафилококк, ботулинус.

Возбудителями загара - потемнения или покраснения мяса рыбы в области спинных мышц являются бактерии рода *Pseudomonas*. Дефект этот возникает в случае, если рыба плохо просаливается или для посола была использована "задержанная" рыба, в мясе которой уже до посола содержались микроорганизмы.

Рыба маринованная. Основным фактором, тормозящим развитие в маринованной рыбе бактерий, в том числе гнилостных, является кислая среда. Некоторое консервирующее действие оказывают добавляемые в маринад соль, сахар, а также пряности, содержащие эфирные масла и обладающие фитонцидными свойствами. Однако нередко пряности бывают сами значительно обсеменены микробами. На маринованной рыбе могут развиваться плесени. При этом снижается кислотность продукта и создается возможность роста гнилостных бактерий. Хранение маринованной рыбы в герметически закрытой таре и на холода предотвращает ее плесневение.

Рыба сушеная и вяленая. При удалении из мяса рыбы воды до определенного предела создаются неблагоприятные условия для развития микробов. В вяленой и солено-сушеной рыбе консервирующее действие оказывает также соль. Некоторые микроорганизмы длительно сохраняются на этой продукции в анабиотическом состоянии. Микрофлора состоит преимущественно из микро-кокков. Встречаются спорообразующие бактерии, молочно-кислые, споры плесеней. При повышении влажности продукта и благоприятной температуре в первую очередь начинают развиваться плесени. Для предотвращения плесневения эту рыбную продукцию необходимо хранить на холода и при относительной влажности воздуха 70-80 %.

Рыба копченая. Консервирующее действие при копчении рыбы оказываются главным образом антисептические вещества дыма (или коптильной жидкости). Кроме антисептиков, при горячем способе копчения на микрофлору рыбы губительное действует высокая температура, а при холодном - соль и подсушивание рыбы. При копчении в толще рыбы сохраняется то или иное количество микроорганизмов. Очень чувствительны к бактерицидным веществам дыма бактерии рода *Pseudomonas*; устойчивы споры бактерий и плесеней, а также многие микрококки.

В 1 г рыбы горячего копчения обнаруживается бактерий 102-104, рыбы холодного копчения - 102-105, а в отдельных случаях и больше.

Допустимая степень обсеменения бактериями свежевыработанной рыбы горячего копчения  $1 \times 10^3$  в 1 г, холодного копчения -  $1 \times 10^4$ . Бактерии группы кишечных палочек и золотистый стафилококк должны отсутствовать в 1 г готовой продукции, а сальмонеллы - в 25 г.

Микрофлора рыбы горячего и холодного копчения сходна между собой и представлена в основном (до 80 % и более) различными микрококками. Встречаются спороносные и не образующие спор палочковидные бактерии, дрожжи, споры плесеней.

Рыба горячего копчения по сравнению с рыбой холодного копчения имеет большую влажность, содержит меньше соли и, кроме того, коптится менее продолжительное время. Все это и обуславливает более быструю порчу ее. Хранить рыбу горячего копчения рекомендуется при низких температурах (от 2 до  $-2^{\circ}\text{C}$ ) в течение не более 72 ч.

На копченой рыбе в первую очередь развиваются плесени (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*), особенно быстро при повышенной относительной влажности воздуха в помещении. Иногда порчу вызывают дрожжи (*Cryptosporidium*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*). Лучше сохраняется копченая рыба, упакованная в пакеты из газонепроницаемых полимерных материалов. Эффективно заполнение пакетов углекислым газом. При таком способе хранения и температуре около  $0^{\circ}\text{C}$  полностью подавляется развитие плесеней и дрожжей, замедляется рост микрококков. Упаковка, кроме того, предотвращает вторичное обсеменение микроорганизмами.

Качество копченой рыбы и стойкость ее при хранении во многом зависят от исходной степени обсеменения микробами рыбы-сырца, а также от соблюдения технологического режима, условий производства и хранения продукции.

Пресервы. Слабосоленая рыбная продукция из мелкой рыбы (килька, салака, хамса и др.), выпускаемая в герметически закрытой таре, - пресервы, помимо соли содержит сахар, специи, растительное масло. Пресервы не подвергают тепловой обработке; для предохранения от порчи в них вводят анти-септик - бензойнокислый натрий (0,1 %). Взамен бензойнокислого натрия или в сочетании с ним рекомендуют использовать сорбиновую

кислоту и антибиотик низин, что также дает хорошие результаты. Некоторый консервирующий эф-фект обеспечивает и поваренная соль.

Микрофлора пресервов в первые дни их изготовления разнообразна: в состав ее входят микроорганизмы рыбы, соли и специй. Последние нередко в значительной степени (104-106 на 1 г) обсеменены спорообразующими аэробными и анаэробными палочковидными бактериями и микроплактами, среди которых имеются солеустойчивые и холдоустойчивые гнилостные формы. В процессе созревания пресервов состав их микрофлоры изменяется. Доминирующими становятся бактерии сем. *Micrococcaceae*, а также молочно-кислые.

В процессах созревания рыбы, помимо ее тканевых и пищеварительных ферментов, немаловажное значение имеют гетероферментативные молочно-кислые бактерии. Будучи устойчивыми к соли и бензойнокислому натрию, они размножаются, сбраживают сахар с образованием кислот (молочной, уксусной) и ароматических веществ. Эти вещества вместе с эфирными маслами специй и продуктами ферментативных процессов участвуют в создании определенного вкуса и запаха - "букета" пресервов.

Снижение pH активизирует некоторые тканевые ферменты рыбы, участвующие в ее созревании.

Кислоты, соль и антисептик, а также низкая температура созревания препятствуют развитию гнилостных споровых бактерий, находящихся в пресервах. Однако некоторые из них, особенно при нарушении технологического режима изготовления и температуры хранения пресервов, могут развиваться и вызывать порчу продукта. В пресервах нередко обнаруживается *Clostridium perfringens* - обитатель кишечника рыб, попадающий и со специями. При активном развитии этой бактерии происходит бомбаж банки. Для повышения стойкости пресервов в хранении рекомендуется пользоваться стерильными специями. Чтобы лучше сохранить ароматические свойства специй, целесообразно проводить их холодную стерилизацию (УФ-лучами,  $\gamma$ -радиацией).

В отличие от стерилизуемых рыбных баночных консервов пресервы не подлежат длительному хранению даже на холода. Возможна радиационная обработка (радуризация) пресервов, позволяющая не только увеличить срок их хранения, но и исключить применение антисептика.

Икра. Икра многих рыб является ценным пищевым продуктом. Ее готовят из ястиков осетровых рыб и дальневосточного лосося. Меньшее значение имеет производство этого продукта из ястиков карповых, сельдевых, треско-вых, например минтая, и других пород. В теле живой рыбы икра стерильна. Для получения высококачественного продукта икру извлекают из живой или только что уснувшей рыбы.

Микрофлора икры состоит из психрофильных микроорганизмов, которые относятся к естественной микрофлоре рыбы. Дальнейший технологический процесс переработки икры на всех этапах связан с применением ручного труда. При этом могут попадать стафилококки, бактерии группы кишечных палочек, споры бактерий и мицелиальных грибов, дрожжи. Поэтому при производстве икорных продуктов необходимо соблюдать высокие санитарно-гигиенические требования: разделочные столы, инвентарь, посуда, руки обработчиков должны быть безукоризненно чистыми. Большое значение имеют чистота воздуха, качество воды, используемой для промывания икры. Так, для снижения количества микроорганизмов промывание икры проводят электрохимически активированной водой.

Свежая, ничем не консервированная икра в короткое время подвергается микробиальной порче. Основной метод консервирования икры - посол. Икру мягкого посола

получают при внесении 3 %-ного раствора поваренной соли; добавление высоких концентраций соли (от 7,5 до 10 %) способствует получению соленой икры. Соль тормозит рост микроорганизмов и снижает обсемененность икры. Для посола икры используют чистую соль, стерилизованную путем прокаливания при температуре 150-160°C в течение 2 ч.

При приготовлении паюсной икры применяют посол ее теплым насыщенным раствором соли, с последующим уплотнением икорной массы. При такой обработке уменьшается содержание влаги в продукте и повышается устойчивость паюсной икры при хранении. Зернистую икру просаливают «су-хим» способом. Эта икра как более влажная сохраняется хуже, чем паюсная. В 1 г слабосоленой икры содержится 5x104 клеток, в соленой – 1x104.

Видовой состав микрофлоры икры очень разнообразен. В нем преобладают главным образом палочковидные мезофильные сапрофиты. Наиболее часто встречаются *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Micrococcus candidas*, *Sarcina lutea* и др. Кроме бактерий в свежесоленой икре обнаружены актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы.

При правильном хранении зернистой икры при температуре от -2 до -4°C наблюдается снижение численности содержащихся в ней микроорганизмов. Под влиянием низкой температуры, солености, низкой влажности, кислой реакции видовой состав микроорганизмов икры становится более однообразным и представлен различными видами рода *micrococcus*. В этих условиях зернистая икра сохраняет хорошее качество в течение 2-3 мес.

Для увеличения срока хранения в икру кроме соли добавляют бензоат натрия, сорбиновую кислоту, триполифосфат натрия. Триполифосфат натрия обладает антиокислительным свойством и улучшает вкус продукта.

Наиболее эффективным методом для подавления жизнедеятельности бактерий и увеличения срока хранения икры осетровых рыб является пастеризация. В 1 г пастеризованной икры содержатся 1·103 клеток. Видовой состав остаточной микрофлоры представлен видами родов *Micrococcus* и *Bacillus*. Для повышения эффективности пастеризации используют композицию из поваренной соли, КНСОЗи соли яблочной кислоты.

Сроки хранения пастеризованной икры зависят от температурных условий. При температуре - 2°C икра сохраняет хорошее качество в течение 12-13 мес., при температуре 18-20°C – 5-6 мес., при 36 °C – 1-1,5 мес. Очень долго хранится пастеризованная икра в замороженном виде. Не большое повышение температуры (до -2°C) приводит к активизации жизнедеятельности микроорганизмов и, следовательно, к ухудшению ее органолептических свойств.

Порча икры выражается в скисании и прогоркании. Главные возбудители порчи икры – бактерии группы *E.coli* и близкие к ней по свойствам *B. lactis aerogenes*, а также *B. rubber*, *Pseudomonas fluorescens*. Они вызывают скисание икры. Кокки и мицелиальные грибы способствуют образованию прогорклого вкуса.

Несколько меньшее значение имеют аэробные спорообразующие палочки *Bac.subtilis*, *Bac.cereus*, так как при хранении икры реакция в ней остается кислой, в пределах pH 6,9-5,9. Кислая среда задерживает развитие этих бактерий и вызываемые ими процессы гниения.

В связи с использованием в значительной степени ручного труда в процессе производства икорных продуктов в них могут попадать условно-патогенные микроорганизмы, в частности бактерии группы кишечных палочек, золотистый стафилококк, сульфитредуцирующие клостридии. Согласно действующим нормативным документам эти микроорганизмы должны отсутствовать в 1 г продукта, патогенные микроорганизмы, включая сальмонеллы, - в 25 г.

Все виды доброкачественной рыбной продукции, в том числе и икра, при эпидемиологическом неблагополучии исследуются на *Vibrio parahaemolyticus*, который не допускается в 1 г в количестве более 10 клеток (СанПиН 2.3.2.560-96). Санитарно-гигиенические условия и строгий контроль производства обеспечивают высокое качество продукта, безопасность и стойкость его при хранении.

Промысловые беспозвоночные. Ракообразные (креветки, крабы, омары, лангусты) и моллюски (гребешки, мидии, устрицы, кальмары) являются скоро-портящимся пищевым сырьем. Помимо микроорганизмов, причиной быстрой порчи является активное воздействие ферментов самого животного.

Большинство промысловых беспозвоночных - придонные животные, по-этому первичная микрофлора их соответствует микрофлоре морских осадков, ила и воды.

Качественный и количественный состав микрофлоры даже одного и того же вида ракообразных или моллюсков различается в зависимости от места, сезона, способа лова.

Ракообразные. Микробиальная обсемененность (МАФАМ) свежевыловленных креветок колеблется от 102 до 106 клеток на 1 г. В основном это бесспоровые аэробные мезофильные и психротрофные бактерии родов *Pseudomonas*, *Moraxela*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, а также *Vibrio*.

Микроорганизмы панцирных покровов, жабр и внутренностей крабов типичны для микрофлоры морского грунта, преобладают спорообразующие бактерии. Мясо крабов живых, не задержанных в сетях, содержит мало бактерий - от единиц до нескольких сотен на 1 г. Преимущественно это бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*.

В свежевыловленных креветках, крабах патогенные и условно-патогенные микроорганизмы обычно отсутствуют или встречаются в небольших количествах. Однако при обработке, контакте с загрязненной палубой и оборудованием возможно инфицирование ракообразных этими микроорганизмами.

Моллюски. Микробиальная обсемененность свежевыловленных мидий, устриц, кальмаров, гребешков колеблется от 102 до 104 клеток на 1 г. Некоторые моллюски добываются в районах, загрязненных сточными водами, поэтому в микрофлоре этих моллюсков, помимо различных водных бактерий (*Moraxela*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*), встречаются, причем летом в большом количестве, представители семейства *Enterobacteriaceae* (энтерококки, кишечная палочка, протей, *Clostridium perfringens* и др.), многие из которых являются условно-патогенными формами.

Чтобы задержать развитие микроорганизмов, выловленных беспозвоночных до момента переработки (изготовление консервов, кулинарных изделий) содержат в льду или замораживают.

В охлажденном состоянии ракообразные и моллюски сохраняются лишь несколько суток, при этом большое значение имеет степень исходного обсеменения их микробами. Так, при 0°C креветки, содержащие бактерий 102 на 1 г, сохранялись 8-9 сут., а содержащие 104

клеток – 5-6 сут. В креветках развивались бактерии родов бактерий *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxela*. Обезглавленные креветки сохранялись дольше, чем целые.

Лангусты с исходной обсемененностью 102 бактерий на 1 г сохранялись во льду до 8-10 сут. без заметного изменения качества, хотя число бактерий возрастало до 103-104 клеток на 1 г. При большей исходной обсемененности – 103-104 в 1 г – уже через 8-9 сут. число бактерий превышало миллион в 1 г и проявлялись признаки порчи. В микрофлоре преобладали псевдомонады.

Таблица 22. Некоторые санитарно-бактериологические нормативы рыбопродуктов.

Наименование	Общая обсемененность (МАФАМ)	Масса продуктов (г), в которой не допускается			Примечание
		БГКП (coliформы)	<i>S.aureus</i>	Сульфит-редуцирующие кломтридии	
Морские беспозвоночные – крабы, криль и др.					
Свежие	$5 \times 10^4$	0,01	0,01	-	
Охлажденные	$1 \times 10^4$	0,001	0,01	-	
Мидии - сырье: для кулинарного производства	$5 \times 10^4$	0,1	0,1	-	
для консервного производства	$1 \times 10^5$	0,1	0,1	-	
Мидии, устрицы, гребешок, живые	$5 \times 10^3$	1,0	1,-	0,1	Энтерококки не допускаются
Фаршевые изделия (крабовые палочки и др.)	$1 \times 10^3$	1,0	1,0	-	

Порчу устриц и мидий вызывали главным образом псевдомонады и мо-лочно-кислые бактерии; порчу гребешков – бактерии родов *Moraxela* и *Acinetobacter*.

Для удлинения сроков хранения охлажденной продукции рекомендуется обработка ее химическими консервантами (растворами метабисульфита натрия, сорбиновой, бензойной, лимонной кислот), а также радиационная обработка. Обработка  $\gamma$ -облучением в дозах 3-5 кГр удлиняет срок хранения в 2-3 раза, количество микробов снижается на 2-3 логарифмических порядка.

Замораживание беспозвоночных – лучший способ их консервирования до переработки и реализации. Сроки хранения измеряются месяцами в зависимости от вида и качества продукта, режима замораживания и хранения.

В период замораживания и последующего хранения отмирает до 90% и более исходной микрофлоры. В остаточной микрофлоре преобладают бактерии кокковой формы и грамотрицательные палочки. Глазировка продукта позволяет удлинить срок хранения.

В реализацию беспозвоночные поступают сырыми в целом виде или вареными, но главным образом их используют для производства консервов.

В результате тепловой обработки ракообразных (бланшировка или варка в течение 2-5 мин) значительно снижается количество микрофлоры, но эффект обработки зависит от степени обсеменения нагреваемого объекта, длительности и температуры обработки. Для увеличения срока хранения вареных ракообразных замораживают. Рекомендуется градиационная обработка продукта, упакованного в полиэтиленовую тару.

Порча креветок (сырых) проявляется в образовании летучих веществ с неприятным запахом. Возбудители - главным образом протеолитические бактерии рода *Pseudomonas*, образующие низкомолекулярные амины (ди- и три-метиламин), а также летучие серосодержащие компоненты с нет приятным запахом. Вызывают порчу и некоторые спорообразующие аэробные бактерии. При порче крабов в них, помимо гнилостных процессов, протекает кислотное брожение сахаров. Признаки порчи отмечаются обычно при общей микробной обсемененности (МАФАМ) 106-107 на 1 г и содержании азота летучих оснований 25 мг%.

#### Особенности санитарно-микробиологического анализа консервов

Перед исследованием осматривают тару, проверяют герметичность (если тара оказывается негерметичной, консервы не подлежат оценке на промышленную стерильность) и термостатируют невскрытые консервы (для проявления жизнедеятельности мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов консервы термостатируют при 30-370С от 5 до 7 сут, а для проявления жизнедеятельности термофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов при 55-620С не менее 3-х сут). После этого приступают к вскрытию банок и посеву на соответствующие питательные среды с дальнейшей идентификацией. Для определения промышленной стерильности в каждой единице упаковки устанавливают присутствие (отсутствие) тех микроорганизмов, наличие которых оговаривает нормативная документация. Если такие требования отсутствуют, в консервах проводят выявление следующих микроорганизмов:

- В консервах группы А (мясные, рыбные и овощные с pH 4,2 и выше; фруктовые с pH 3,8 и выше; сгущенные стерилизованные молочные консервы) – мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов.
- В консервах группы Б (неконцентрированные и концентрированные томатопродукты) – мезофильных анаэробных и молочнокислых бактерий, а также плесневых грибов и дрожжей.
- В консервах группы В (слабокислые овощные маринады, салаты, винегреты и другие с pH 3,7-4,2) – мезофильных анаэробных и молочнокислых бактерий, а также плесневых грибов и дрожжей.
- В консервах группы Г (квашеная капуста, овощные маринады с pH менее 3,7; фруктовые консервы с pH менее 3,8) – плесневых грибов и дрожжей, молочнокислых бактерий.
- В консервах группы Е (пастеризованные газированные фруктовые соки и напитки с pH 3,7 и ниже) – ОМЧ, наличие плесневых грибов, дрожжей, молочнокислых бактерий и БГКП.

Оценку результатов осуществляют по каждой упаковочной единице консервов отдельно. Если в нормативном документе на определенные виды консервов не приведены

требования к видовому составу и количеству обнаруженных микроорганизмов, то при оценке руководствуются следующими признаками:

Для групп А и Б допускается наличие бацилл группы *B. subtilis*; их количество не должно превышать 11 КОЕ в 1 г или 1 см<sup>3</sup> продукта. Содержание клостридий (*C. botulinum*, *C. perfringens*) не должно превышать одну клетку в 1 г или 1 см<sup>3</sup> продукта (в детском питании наличие клостридий не допустимо). Также в продуктах этой группы не допускается наличие споронеобразующих бактерий, кокков, плесневых грибов и дрожжей.

Для группы В допускается наличие газонеобразующих мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бацилл (не более 90 КОЕ 1 см<sup>3</sup> продукта), клостридий, исключая *C. botulinum*, *C. Perfringens* (не более одной клетки в 1 г или 1 см<sup>3</sup> продукта). В детском питании наличие клостридий не допустимо. В консервах не должны присутствовать споронеобразующие бактерии, кокки, плесневые грибы и дрожжи.

Для группы В не допустимо наличие споронеобразующих бактерий, кокков, плесневых грибов и дрожжей.

Для группы Е – ОМЧ не должно превышать 50. В 1 см<sup>3</sup> не допускается наличие молочнокислых бактерий и дрожжей; допустимо присутствие плесневых грибов не более 5 КОЕ. Наличие БГКП в 1 л (дм<sup>3</sup>) продукта не допустимо.

## САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДМЕТОВ ОБИХОДА И РУК ПЕРСОНАЛА

Биологическая контаминация предметов окружающей среды происходит постоянно. Источниками их микробного загрязнения являются человек, животные, насекомые. Загрязнение происходит также из воздуха с пылью и аэрозолями, из почвы и воды. При этом на окружающих предметах обнаружаются как сапротрофные, так и условно-патогенные микроорганизмы.

Попавшие на предметы окружающей среды микроорганизмы, в том числе и патогенные, как правило, не размножаются на них. Такие предметы служат пассивными посредниками при передаче возбудителей инфекционных болезней и условно-патогенных микроорганизмов. Большая часть микробов погибает в первые часы пребывания на объектах внешней среды, за исключением тех, которые остаются в складках, трещинах, впадинах, где они меньше подвергаются высыханию и инсоляции. Длительно сохраняются спорообразующие бактерии. Например, споры бацилл сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) могут годами находиться в изделиях из меха, шерсти, кожи животных, погибших от этого заболевания.

Продолжительность сохранения жизнеспособности некоторых патогенных микроорганизмов на различных объектах представлена в таблице 23.

Таблица 23. Длительность сохранения жизнеспособности патогенных микроорганизмов на объектах окружающей среды (Кочемасова и др., 1987).

Микроорганизмы	Сроки выживания (дни)		
	на бумаге	на тканях и одежде	на посуде (стекло)
<i>Salmonella typhi</i>	60	до 80	до 70
<i>Shigella sp.</i>	14-60	17-36	до 25
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2-36	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	8	5-28	до 18
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	до 330	до 226

Изучение бактериальной загрязненности рук и различных предметов обихода производится в целях оценки санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта, установления распространения инфекций при эпидемиологических заболеваниях, лабораторного контроля эффективности обработки кожи рук.

В зависимости от цели проводимого исследования и характера контролируемых объектов в полученных смывах определяют:

- общую микробную обсемененность (обычно с пересчетом 1 см<sup>2</sup> исследуемой поверхности);
- наличие бактерий группы кишечной палочки, как показателей фекального загрязнения;
- наличие патогенных бактерий кишечной группы, обнаружение которых является безусловным показателем эпидемического неблагополучия;
- наличие стафилококков и других микроорганизмов.

## **МИКРОБИОТА ЧЕЛОВЕКА. МИКРОФЛORA ПОЛОСТИ РТА**

Полость рта является исключительно благоприятной средой для существования и размножения самых различных видов микроорганизмов. Это обусловлено постоянным наличием питательных веществ, оптимальной для размножения многих микроорганизмов температурой 370С, влажностью и pH (около 6,9-7,0). Микрофлора полости рта подразделяется на постоянную и случайную. Обычными представителями нормальной микрофлоры ротовой полости являются стрептококки: факультативно-анаэробные (в том числе *Streptococcus salivaris*, *S. mitis*, кариесогенные- *S. mutans* и др.) и облигатные анаэробы (*Peptostreptococcus*), а также грамположительные нитевидные микрорганизмы (*Actinomyces viscosus*). В составе микрофлоры полости рта можно обнаружить также лактобациллы, грамотрицательные кокки, относящиеся к родам *Neisseria* и *Velionella*, а также грамотрицательные бактерии, строгие анаэробы из семейства *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*). В состав постоянной микрофлоры полости рта входят различные виды спирохет (*Treponema denticola*, *T. orale*, *T. macrodenticum*, *Borellia buccalis*), микоплазмы, нокардии и др. к случайной микрофлоре полости рта относятся комменсалы, обитающие на других слизистых оболочках и коже, сапротрофы внешней среды и различные патогенные микроорганизмы, которые попадают в полость рта в результате аэрогенного или алиментарного заражения от больных или бактерионосителей. Очень высокой способностью адаптироваться к существованию в ротовой полости обладают стафилококки, стрептококки, коринебактерии, грибы *Candida*, вирусы герпеса, эпидемического паротита и др.

### **МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АНТИМИКРОБНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ**

Достижения научно - технического прогресса способствовали развитию новых биологических технологий создания диагностических, лечебных и профилактических препаратов, решению проблем сбалансированности питания, экологических проблем. Основные принципы биотехнологии - ферментация, культивирование микроорганизмов, растительных и животных клеток, генная и клеточная инженерия. Генная инженерия - сердцевина современной биотехнологии.

На основе достижений генетики разработаны высокоточные методы диагностики и идентификации микроорганизмов - определение плазмидного профиля, рестрикционный анализ, ДНК-гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и мн.др. Методы основаны на использовании ряда специфических ферментов - рестриктаз (ферментов, расщепляющих ДНК в специфических участках), лигаз или синтетаз (обеспечивают соединение двух молекул), в частности ДНК - лигаз (получение рекомбинантных молекул ДНК), полимераз (ДНК - зависимая ДНК - полимераза обеспечивает ПЦР - многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности).

Плазмиды (F-плазмиды) и вирусы (бактериофаги) используют в генной инженерии в качестве векторов для переноса генетического материала (генов). Метод клонирования заключается в том, что выделенный фрагмент (ген) вводится в состав плазмида или другой самореплицирующейся системы и накапливается в размножающихся клетках. Практический вариант использования: микроорганизмы - продуценты биологически активных веществ (в

том числе вакцин). Гибридомную технологию используют для получения моноклональных антител (МКА).

Кроме клонирования для получения генов используют секвенирование и химический синтез. С помощью генно-инженерных методов получают вакцины, антигены, диагностикумы, гормоны, иммуномодуляторы. Одним из крупных разделов биотехнологии является производство антибиотиков и различных химиотерапевтических препаратов антибактериального действия.

Методы воздействия на микроорганизмы по виду использованного фактора можно разделить на физические и химические, по характеру воздействия - на неизбирательные (обеззараживание - дезинфекция, стерилизация) и избирательные (химиотерапевтические).

#### Физические методы

1. Термическая обработка - прокаливание, кипячение, пастеризация, автоклавирование.

2. Облучение - ультрафиолетовое, гамма- и рентгеновское, микроволновое.

3. Фильтрование (оптимально - бактериологические фильтры с диаметром пор около 200 нм).

#### Химические методы

1. Неспецифического действия - дезинфектанты (обработка помещений и др., антисептики - обработка живых тканей). Среди них - препараты йода и хлора, спирты, альдегиды, кислоты и щелочи, соли тяжелых металлов, катионные детергенты, фенолы, окислители, природные препараты - деготь, ихтиол, хлорофиллпнт.

2. Избирательно подавляющие жизнедеятельность микроорганизмов - антибиотики и химиотерапевтические препараты.

Эре антибиотикотерапии предшествовал период разработки антимикробных химиопрепаратов. Некоторые вехи: в 1891г. Д.А.Романовский сформулировал основные принципы химиотерапии инфекционных болезней, предложил хинин для лечения малярии, П.Эрлих в 1906г. предложил принцип химической вариации. Синтезированы производные мышьяка сальварсан и неоса-льварсан, предложен химиотерапевтический индекс. Круг химиопрепаратов постепенно расширялся. В 1932г. открыты подходы к созданию сульфанила-мидных препаратов. Однако поистине революционное значение имело открытие антибиотиков.

Одним из универсальных механизмов антагонизма микроорганизмов является синтез антибиотиков, которые тормозят рост и размножение микроорганизмов (бактериостатическое действие) или убивают их (бактерицидное действие). Антибиотики - вещества, которые могут быть получены из микроорганизмов, растений, животных тканей и синтетическим путем, обладающие выраженной биологической активностью в отношении микроорганизмов.

Таких веществ известно несколько тысяч, однако реально используют значительно меньше. Существует ряд требований к антибиотикам, существенно ограничивающих их терапевтическое применение:

- эффективность в низких концентрациях;
- стабильность в организме и в различных условиях хранения;
- низкая токсичность или ее отсутствие;
- выраженный бактериостатический и (или) бактерицидный эффект;
- отсутствие выраженных побочных эффектов;
- отсутствие иммунодепрессивного воздействия.

Первыми открытыми антибиотиками были пенициллин (Флеминг) и стрептомицин (Ваксман).

Антибиотики могут быть разделены по происхождению, направленности и спектру действия, по механизму действия.

По происхождению антибиотики могут быть:

- бактериального (полимиксин, грамицидин);
- актиномицетного (стрептомицин, левомицетин, эритромицин);
- грибкового (пенициллин);
- растительного (рафанин, фитонциды);
- животного происхождения (интерфероны, лизоцим).

Больше всего известно антибиотиков актиномицетного происхождения. Актиномицеты - преимущественно почвенные микроорганизмы. В условиях большого количества и разнообразия почвенных микроорганизмов их антагонизм, в том числе с помощью выработки антибиотиков - один из механизмов их выживания.

По спектру действия антибиотики разделяют на:

- действующие преимущественно на грамположительную микрофлору - пенициллин, эритромицин;
- действующие преимущественно на грамотрицательную микрофлору - полимиксин;
- широкого спектра действия (на грам-плюс и грам-минус флору) - стрептомицин, неомицин;
- противогрибковые - нистатин, амфотерцин, леварин, низорал;
- противотуберкулезные - стрептомицин, канамицин;
- противоопухолевые - рифампицин;
- противовирусные - интерферон, зовиракс, ацикловир.

Антибиотики разделяют по механизму действия:

- ингибиторы синтеза пептигликана клеточной стенки (пенициллин, цефалоспорин, ванкомицин, ристомицин). Действуют на имеющих клеточную стенку растущие бактерии, не действуют на L-формы, покоящиеся формы бактерий;
- ингибиторы синтеза белка (стрептомицин, левомицетин, тетрациклин);
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов и аминокислот (налидиксовая кислота, рифампицин);
- ингибиторы синтеза мембраны и цитоплазматической мембраны грибов (nistatin, полимиксин).

Побочное действие антибиотиков

Для макроорганизма:

- токсическое действие;
- дисбактериозы;
- аллергические реакции;
- иммунодепрессивное действие;
- эндотоксический шок.

Для микроорганизмов:

- формирование атипичных форм микробов;
- формирование антибиотикорезистентных и антибиотикозависимых форм микроорганизмов.

Биохимические и генетические механизмы лекарственной устойчивости микроорганизмов. Существует два типа лекарственной устойчивости - естественная (природная) и приобретенная (в результате мутаций, обмена R- плазмидами др.).

Естественная лекарственная устойчивость является видовым признаком, чаще связана с недоступностью антибиотика к его мишени, т.е. невозможностью осуществления его механизма действия. В природных условиях, особенно в почве, микроорганизмы находятся в конкурентной борьбе за суб-страты. Антибиотики - один из селективных факторов отбора. Микроорганизмы - продуценты антибиотиков защищены от синтезируемых антибиотиков генетическими механизмами (генетически детерминированная устойчивость, кодируемая в хромосоме или обусловленная наличием R- плазмид). Микроорганизмы в условиях совместного обитания вынуждены вырабатывать устойчивость к антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам у микробов может быть связана с негенетическими факторами (низкая метаболическая активность, переход в L- форму).

Основную роль в лекарственной устойчивости принадлежит R- плазмидам, способным передаваться в другие бактерии и формировать своеобразный генофонд лекарственной устойчивости микроорганизмов. Резистентность современных стафилококков к пенициллину доходит до 100%.

На биохимическом уровне в формировании резистентности могут участвовать различные механизмы.

1. Разрушение молекулы антибиотика (пенициллины и другие бета - лактамные антибиотики разрушаются ферментом бета - лактамазой).
2. Модификация структуры молекулы антибиотика, приводящая к утрате биологической активности (так действуют изоферменты).
3. Изменение структуры мишеней, чувствительных к антибиотику (белков 70S рибосом - устойчивость к тетрациклинам, стрептомицину, макролидам, гираз - к хинолонам, рнк - полимераз - к рифампицину, пенициллинсвязывающих белков - транспептидаз - к бета - лактамам).
4. Образование бактериями "обходного" пути метаболизма.
5. Формирование механизмов активного выведения антибиотика из клетки.

Из-за формирования антибиотикоустойчивых популяций микроорганизмов с целью эффективного лечения необходимо предварительно определять чувствительность данного антибиотика к выделенной культуре возбудителя.

Основными методами определения антибиотикочувствительности бактерий *in vitro* является метод серийных разведений, диффузии в агар (бу-мажных дисков), определение способности к продукции бета - лактамазы, *in vivo* - на модели безмикробных животных, определение концентрации антибиотиков в крови и моче.

Метод диффузии в агар с применением стандартных дисков, пропитанных различными антибиотиками в определенных концентрациях (зависят от терапевтической дозы и соответствуют рекомендациям ВОЗ). Основан на использовании стандартных питательных сред, дисков и методов. Оценка результатов связана с существованием зависимости между размером зоны подавления роста исследуемых культур вокруг дисков и значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК) соответствующих антибиотиков (чувствительностью микроорганизмов). Имеются специальные таблицы для оценки результатов, в соответствии с которыми культуры определяют как чувствительные, умеренно устойчивые и устойчивые (резистентные) к тестируемому антибиотику.

Метод серийных разведений антибиотиков позволяет более точно определить МПК, однако из-за громоздкости применяется реже.

Бета - лактамазный тест (определение способности к образованию бета - лактамаз) чаще определяют методом дисков с нитроцефином - цефалоспирином, изменяющим окраску дисков при гидролизе. Положительный тест свидетельствует о резистентности бактерий ко всем бета- лактамазам - чувствительным пенициллинам.

Существует ряд причин, обуславливающих различную чувствительность микроорганизмов к антибиотикам *in vitro* и *in vivo*.

На антимикробную активность *in vitro* влияют многие факторы, в том числе:

- pH среды;
- компоненты среды;
- концентрация микроорганизмов;
- условия и время культивирования.

На антимикробную активность препаратов *in vivo* также влияют различные факторы, из которых необходимо отметить:

- фармакодинамику препарата в организме (скорость всасывания, выведения, расщепления и т.д.);

- локализацию микробов в организме (особенно внутриклеточную локализацию).

## УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

Исторически слово “инфекция” (лат. *inficio* - заражать) впервые было введено для обозначения венерических болезней.

Инфекция - совокупность всех биологических явлений и процессов, возникающих в организме при внедрении и размножении в нем микроорганизмов, результат взаимоотношений между макро- и микроорганизмом в виде адаптационных и патологических процессов в организме т.е. инфекционного процесса.

Инфекционная болезнь - наиболее выраженная форма инфекционного процесса.

В общебиологическом плане взаимоотношения микро- и макроорганизмов представляют собой симбиоз (т.е. сожительство), так как все живые существа существуют в природе. Человек существует на планете Земля с микроорганизмами, растениями, животными. Основными формами взаимодействия микро- и макроорганизмов (их симбиоза) являются: мутуализм, комменсализм, паразитизм.

Мутуализм - взаимовыгодные отношения (пример - нормальная микрофлора).

Комменсализм - выгоду извлекает один партнер (микроб), не причиняя особого вреда другому. Необходимо отметить, что при любом типе взаимоотношений микроорганизм может проявить свои патогенные свойства (пример - условно-патогенные микробы-комменсалы в иммунодефицитном хозяине).

Паразитизм - крайняя форма антагонистического симбиоза, когда микроорганизм питается за счет хозяина, т.е. извлекает выгоду, нанося при этом вред хозяину.

Микробный паразитизм носит эволюционный характер. В процессе перехода от свободноживущего к паразитическому типу жизнедеятельности микроорганизмы теряют ряд ферментных систем, необходимых для существования во внешней среде, но приобретают ряд свойств, обеспечивающих возможность паразитизма.

Основные этапы инфекционного процесса

1. Адгезия - прикрепление микроорганизма к соответствующим клеткам хозяина.
2. Колонизация - закрепление микроорганизмов в соответствующем участке.
3. Размножение (увеличение количества - мультипликация).

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

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

Инфекционный процесс может быть:

по длительности - острый и хронический.

Острая циклическая инфекция заканчивается элиминацией (удалением) возбудителя или смертью больного. При хронической инфекции возбудитель длительно сохраняется в организме (это состояние называется персистенция). Для персистенции микроорганизмы имеют ряд механизмов - внутриклеточная локализация (укрываются в клетке), переход в не имеющие клеточной стенки L- формы, антигенная мимикрия (совпадение по химическому составу антигенных детерминант микробы и клеток хозяина), укрытие в локальных очагах и заба-рьерных органах (головной мозг). Для вирусов дополнительными факторами персистенции является интеграция генома вируса с хромосомой клетки- мишени, недоступность действию антител, наличие дефектных вирусных частиц и слабая индукция иммунного ответа и др. Персистенция в организме и перио-дическая смена хозяина - два основных механизма поддержания микробных популяций.

по степени распространения - локальный и генерализованный.

Локальный инфекционный процесс - возбудитель сосредоточен в определенном очаге, не выходя за его пределы, что сдерживает механизмы защиты. Если микроорганизм способен диссеминировать по организму, возникает гене-рализованный процесс. Существует два основных пути распространения - лимфогенный (по лимфатической системе) и гематогенный (по кровяным сосудам).

по выраженности - манифестный и инаппаратный.

Манифестный (ярко выраженный) инфекционный процесс - инфекционная болезнь - типичная, атипичная, хроническая и т.д. Бессимптомный (инап-паратный) инфекционный процесс характерен для латентной инфекции. Размножение возбудителя в организме не сопровождается клиническими проявлениями, а только иммунными реакциями.

Инфекционные заболевания имеют ряд особенностей: наличие возбудителя, заразность, цикличность течения.

Динамика развития инфекционной болезни. Инфекционные заболевания характеризуются цикличностью, сменой периодов.

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

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

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

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

Бактерионосительство может иметь большое значение в распространении многих инфекций. Может наблюдаться как при латентной инфекции, так и после перенесенного инфекционного заболевания. Особое значение при некоторых инфекциях имеют хронические носители (брюшной тиф, вирусный гепатит В).

Инфекционное заболевание возникает не при каждом попадании патогенного микроорганизма в организм человека. Требуются определенные условия для реализации:

- достаточная доза микроорганизмов (понятие о критических дозах). Чума- несколько бактериальных клеток, дизентерия- десятки, для некоторых возбудителей- тысячи- сотни тысяч;

- естественный путь проникновения. Существует понятие о входных во-ротах инфекции, различных для различных групп инфекций- раневых, респираторных, кишечных, урогенитальных с различными механизмами заражения (глаза, кожа, дыхательные пути, желудочно- кишечный тракт, мочеполовая система и др.);

- характеристики возбудителя, его болезнетворные свойства, способность преодолевать защитные механизмы хозяина;

- состояние организма хозяина (наследственность- гетерогенность чело-веческой популяции по восприимчивости к инфекции, пол, возраст, состояние иммунной, нервной и эндокринной систем, образ жизни, природные и социаль-ные условия жизни человека и др.).

Патогенность (“рождающий болезнь”) - способность микроорганизма вызывать заболевание. Это свойство характеризует видовые генетические осо-бенности микроорганизмов, их генетически детерминированные характеристики, позволяющие преодолеть защитные механизмы хозяина, проявить свои па-тогенные свойства.

Вирулентность - фенотипическое (индивидуальное) количественное вы-ражение патогенности (патогенного генотипа). Вирулентность может варьиро-вать и может быть определена лабораторными методами (чаще- DL50- 50% летальная доза- количество патогенных микроорганизмов, позволяющая вы-звать гибель 50% зараженных животных).

По способности вызывать заболевания микроорганизмы можно разде-лить на патогенные, условно-патогенные, непатогенные. Условно-патогенные микроорганизмы обнаруживают как в окружающей среде, так и в составе нор-мальной микрофлоры. В определенных условиях (иммунодефицитные состояния, травмы и операции с проникновением микроорганизмов в ткани) они могут вызывать эндогенные инфекции.

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

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

Адгезины и факторы колонизации- чаще поверхностные структуры бак-териальной клетки, с помощью которых бактерии распознают рецепторы на мембранах клеток, прикрепляются к ним и колонизируют ткани. Функцию ад-гезии выполняют пили, белки наружной мембраны, ЛПС, тейхоевые кислоты, гемагглютинины вирусов. Адгезия- пусковой механизм реализации патогенных свойств возбудителей.

Факторы инвазии, проникновения в клетки и ткани хозяина. Микроорга-низмы могут размножаться вне клеток, на мембранах клеток, внутри клеток. Бактерии выделяют

вещества, способствующие преодолению барьеров хозяина, их проникновению и размножению. У грамотрицательных бактерий это обычно белки наружной мембранны. К этим же факторам относятся ферменты патогенности.

Ферменты патогенности - это факторы агрессии и защиты микроорганизмов. Способность к образованию экзоферментов во многом определяет инвазивность бактерий-возможность проникать через слизистые, соединительно-тканые и другие барьеры. К ним относятся различные литические ферменты- гиалуронидаза, коллагеназа, лецитиназа, нейраминидаза, коагулаза, протеазы. Более подробно их характеристика дана в лекции по физиологии микро-организмов.

Важнейшими факторами патогенности считают токсины, которые можно разделить на две большие группы - экзотоксины и эндотоксины (табл. 24).

Таблица 24. Характеристика микробных токсинов (Джавец, 1982; Мудрецова-Висс, 1978, Колычев, 1991).

Экзотоксины	Эндотоксины
Легко проникает в окружающую среду из микробных клеток.	Прочно связаны с телом микробной клетки.
Яды высшей активности.	Менее ядовиты.
В химическом отношении представляют собой белки.	Чаще липосахариды в соединении с белком.
Термолабильны.	Термостабильны.
Разрушаются протеолитическими ферментами.	Сравнительно устойчивы к действию протеолитических ферментов.
Под воздействием формалина переходят в анатоксины.	Формалин мало понижает токсичность

Экзотоксины продуцируются во внешнюю среду (организм хозяина), обычно белковой природы, могут проявлять ферментативную активность, могут секретировать как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Они обладают очень высокой токсичностью, термически нестабильны, часто проявляют антиметаболитные свойства. Экзотоксины проявляют высокую иммуногенность и вызывают образование специфических нейтрализующих антител - антитоксинов. По механизму действия и точке приложения экзотоксины отличаются - цитотоксины (энтеротоксины и дерматонекротоксины), мембранотоксины (гемолизины, лейкоцидны), функциональные блокаторы (холероген), эксфолианты и эритрогенины. Микрофлоры, способные продуцировать экзотоксины, называют токсигенными.

Эндотоксины высвобождаются только при гибели бактерий, характерны для грамотрицательных бактерий, представляют собой сложные химические соединения клеточной стенки (ЛПС). Токсичность определяется липидом А, токсин относительно термостабильен; иммуногенные и токсические свойства выражены более слабо, чем у экзотоксинов.

Наличие капсул у бактерий затрудняет начальные этапы защитных реакций-распознавание и поглощение (фагоцитоз). Существенным фактором инвазивности является подвижность бактерий, обусловливающая проникновение микробов в клетки и в межклеточные пространства.

Факторы патогенности контролируются:

- генами хромосомы;

- генами плазмид;
- генами, привнесенными умеренными фагами.

Иммунитет, виды и формы. Структура иммунной системы. Факторы неспецифической защиты

Первоначально иммунология возникла как наука о невосприимчивости (иммунитете) к инфекционным болезням. Наиболее существенный вклад в ее создание внесли И.И.Мечников (фагоцитарная или клеточная теория иммунитета) и П.Эрлих (гуморальная теория).

В настоящее время считается, что наследственный (врожденный, видо-вой) и приобретенный иммунитет зависит от согласованной деятельности пяти основных систем: макрофагов, комплемента, интерферонов, Т- и В- лимфоцитов, главной системы гистосовместимости (МНС - в английском варианте), обеспечивающих различные формы иммунного ответа.

В современном понимании иммунология- это не только наука, изучаю-щая защиту от инфекционных заболеваний. Иммунология - наука, изучающая механизмы самозащиты организма от всего генетически чужеродного, под-держания структурной и функциональной целостности организма (гомеостаза организма).

Центральным биологическим механизмом иммунитета является ме-ханизм распознавания «своего» и «чужого». Пример - необходимость защиты от собственных мутантных и раковых клеток (одномоментно в организме нахо-дится около 10 млн. измененных клеток).

Иммунитет - целостная система биологических механизмов самозащи-ты организма, с помощью которых он распознает и уничтожает все чужерод-ное (генетически отличающееся).

Выделяют две основные формы иммунитета - видовой (врожденный) и приобретенный. Приобретенный иммунитет может быть естественный (ре-зультат встречи с возбудителем) и искусственный (иммунизация), активный (вырабатываемый) и пассивный (получаемый), стерильный (без наличия воз-будителя) и нестерильный (существующий в присутствии возбудителя в орга-низме), гуморальный и клеточный, системный и местный, по направленности - антибактериальный, антивирусный, антитоксический, противоопухолевый, антитрансплантационный.

В основе видового иммунитета лежат различные механизмы естествен-ной неспецифической резистентности. Среди них - кожные покровы и слизи-стые оболочки, нормальная микрофлора организма, фагоцитоз, воспаление, лихорадка, система комплемента, барьерные механизмы лимфоузлов, проти-вомикробные вещества, выделительные системы организма, главная система гистосовместимости.

Кожа и слизистые - первая линия защиты против возбудителей. Кроме функции механического (анатомического) барьера кожа обладает бактери-цидной активностью. Слизь, лизоцим, желудочный сок, слезная жидкость, слюна, деятельность мерцательного эпителия способствует защите слизистых оболочек.

Нормальная микрофлора организма препятствует колонизации орга-низма посторонней микрофлорой (конкуренция за субстраты, различные фор-мы антагонизма, в т.ч. выделение антибиотических веществ, изменение рН и др.).

Фагоцитоз и система комплемента - вторая линия защиты организма против микроорганизмов, преодолевших поверхностные барьеры. Клеточные факторы системы видовой резистентности - фагоциты, поглощающие и раз-рушающие патогенные

микроорганизмы и другой генетически чужеродный материал. Представлены полиморфоядерными лейкоцитами или гранулоцитами - нейтрофилами, эозинофилами и базофилами (клетками миелопоэтического ряда), а также моноцитами и тканевыми макрофагами (клетками макрофагально-моноцитарной системы).

Значение фагоцитирующих клеток для защиты организма впервые доказал И.И.Мечников, разработавший фагоцитарную теорию иммунитета.

#### Стадии фагоцитоза

Процесс фагоцитоза (поглощения твердофазного объекта) состоит из пяти стадий.

1. Активация (усиление энергетического метаболизма). Факторами активации и хемотаксиса являются бактериальные продукты (ЛПС, пептиды), компоненты комплемента (C3 и C5), цитокины и антитела.

2. Хемотаксис.
3. Адгезия.
4. Поглощение.
5. Исход фагоцитоза.

Адгезия связана с наличием ряда рецепторов на поверхности фагоцитов (к Fc-фрагментам антител, компонентам комплемента, фибронектину), обеспечивающих прочность рецептора - опосредованных взаимодействий опсонинов, обволакивающих микроорганизмы и ограничивающих их подвижность (анти-тела, фибронектин).

Фагоциты обладают амебоподобными псевдоподиями. При поглощении образуется фагосома с поглощенным объектом (бактерией), к ней присоединяется и сливается содержащая лизические ферменты лизосома, образуется фаголизосома.

Возможно три исхода фагоцитоза:

- завершенный фагоцитоз;
- незавершенный фагоцитоз;
- процессинг антигенов.

Завершенный фагоцитоз - полное переваривание микроорганизмов в клетке-фагоците.

Незавершенный фагоцитоз - выживание и даже размножение микроорганизмов в фагоците. Это характерно для факультативных и особенно - облигатных внутриклеточных паразитов. Механизмы персистирования в фагоцитах связаны с блокадой фагосомо-лизосомального слияния (вирус гриппа, ми-кобактерии, токсоплазмы), резистентностью к действию лизосомальных ферментов (гонококки, стафилококки), способностью микробов быстро покидать фагосомы после поглощения и длительно пребывать в цитоплазме (риккетсии).

В процессе фагоцитоза происходит "окислительный взрыв" с образованием активных форм кислорода, что обеспечивает бактерицидный эффект.

К одной из важнейших функций макрофагов (наряду с хемотаксисом, фагоцитозом, секрецией биологически активных веществ) является переработка (процессинг) антигена и представление его иммунокомпетентным клеткам с участием белков главной системы гистосовместимости (МНС) класса 2.

Фагоцитоз - не только уничтожение чужеродного, но и представление антигена для запуска иммунных реакций и секреции медиаторов иммунных и воспалительных реакций. Система макрофагов - центральное звено не только естественной резистентности (видового иммунитета), но и играет важную роль в приобретенном иммунитете, кооперации клеток в иммунном ответе.

Воспаление как защитная реакция организма на различные повреждения тканей возникло на более высокой ступени эволюции, чем фагоцитоз и характерно для высокоорганизованных организмов, обладающих кровеносной и нервной системами.

Инфекционное воспаление сопровождается различными сосудистыми и клеточными (включая фагоцитоз) реакциями, а также запуском целого ряда медиаторов воспалительных реакций (гистамина, серотонина, кининов, белков острой фазы воспаления, лейкотриенов и простагландинов, цитокинов, системы комплемента).

Многие бактериальные продукты активируют клетки макрофагально-моноцитарной системы и лимфоциты, отвечающие на них выделением биологически активных продуктов-цитокинов, в частности интерлейкинов. Их можно характеризовать как медиаторы клеточных иммунных реакций. В воспалительных реакциях основную роль имеет интерлейкин-1 (ИЛ-1), стимулирующий лихорадку, повышающий проницаемость сосудов и адгезивные свойства эндотелия, активирующий фагоциты.

Лихорадка. Повышение температуры тела - защитная реакция организма, ухудшающая условия для размножения многих микроорганизмов, активирует макрофаги, ускоряет кровоток и усиливает обменные процессы в организме.

Барьерные функции лимфоузлов. По выражению П.Ф.Здродовского (1969) лимфоузлы - своеобразный биологический фильтр для возбудителей, переносимых с лимфой. Здесь проникшие через кожу или слизистые и занесенные током лимфы микроорганизмы задерживаются и подвергаются действию макрофагов и активированных лимфоцитов.

Система комплемента - комплекс белков и гликопротеидов сыворотки крови человека и позвоночных животных (их более 20). Отдельные компоненты опосредуют процессы воспаления, опсонизацию чужеродных фрагментов для последующего фагоцитоза, участвуют наряду с макрофагами в непосредственном уничтожении микроорганизмов и других чужеродных клеток (лизис бактерий и вирусов). В условиях физиологической нормы компоненты системы комплемента находятся в неактивной форме. Известны три пути активации системы комплемента - классический, альтернативный и с использованием C1-шунта.

Классический путь - каскад протеазных реакций с компонентом C1q до C9, реализуется при наличии антител к соответствующему антигену. С комплексом "антigen - антитела" взаимодействует компонент C1q, затем C4, следом - C2. Образуется комплекс "антиген-антитела - C1C4C2", с ним соединяется C3 (центральный компонент системы) и запускается цепь активации с эффекторными функциями (опсонизация и лизис бактерий, активация системы макрофагов, воспаление).

Альтернативный путь реализуется при первичном контакте с возбудителем (когда еще нет антител). Он индуцируется ЛПС и другими микробными антигенами. C1, C4, C2 не участвуют, альтернативный и классический пути смыкаются на уровне C3.

Система интерферонов. Интерфероны - синтезируемые различными клетками организма гликопротеиды широкого спектра биологической активности (прежде всего антивирусной), быстрый ответ организма на получение клетками неспецифического сигнала чужеродности. Существует целая система интерферонов, которые разделены на альфа, бета и гамма подтипы с выраженной гетерогенностью свойств. Противовирусное действие проявляется в способности подавлять внутриклеточное размножение ДНК- и РНК-вирусов (прежде всего в результате блокировки синтеза вирусных макромолекул). Индукцию синтеза интерферонов вызывают вирусы, бактерии, риккетсии, простейшие, синтетические соединения.

Киллерные клетки. В обеспечении видового иммунитета существенную роль принадлежит Т - цитотоксическим лимфоцитам ( Т- киллерам), а также главной системе гистосовместимости (подробнее- в следующих лекциях).

Т- киллеры по представлению антигенов главной системы гистосовместимости класса 1 распознают любые чужеродные антигены (включая му-тантные, например - раковые клетки), атакуют и уничтожают их.

Клетки NK (natural killer - натуральные киллеры) имеют важное значение в поддержании генетического гомеостаза и противоопухолевой защите, их функции распознавания не зависят от представления антигенов МНС (major histocompatibility complex) класса 1.

Системы неспецифической резистентности и видового иммунитета способствуют поддержанию структурной и функциональной целостности организма и являются основой для формирования приобретенного (специфического) иммунитета. Стыкуясь на этом, более высоком уровне, системы видового и приобретенного иммунитета образуют единую и наиболее эффективную систему самозащиты организма от всего чужеродного.

Иммунная система - совокупность органов, тканей и клеток, обеспечивающих клеточно-генетическое постоянство организма. Принципы антигенной (генетической) чистоты основываются на распознавании "своего - чужого" и в значительной степени обусловлены системой генов и гликопротеидов (продуктов их экспрессии) - главным комплексом гистосовместимости (МНС), у человека часто называемой системой HLA (human leucocyte antigens). На лейкоцитах человека четко экспрессированы белки МНС, с помощью исследования лейкоцитов типируют антигены МНС.

Органы иммунной системы. Выделяют центральные (костный мозг - кроветворный орган, вилочковая железа или тимус, лимфоидная ткань кишечника) и периферические (селезенка, лимфатические узлы, скопления лимфоидной ткани в собственном слое слизистых оболочек кишечного типа) органы иммунитета.

Клетки - предшественники иммунокомпетентных клеток продукцируются костным мозгом. Некоторые потомки стволовых клеток становятся лимфоцитами. Лимфоциты подразделяют на два класса - Т и В. Предшественники Т - лимфоцитов мигрируют в тимус, где созревают в клетки, способные участвовать в иммунном ответе. У человека В - лимфоциты созревают в костном мозге. У птиц незрелые В - клетки мигрируют в сумку (бурсу) Фабрициуса, где достигают зрелости. Зрелые В - и Т - лимфоциты заселяют периферические лимфоузлы. Таким образом, центральные органы иммунной системы осуществляют образование и созревание иммунокомпетентных клеток, периферические органы обеспечивают адекватный иммунный ответ на антигенную стимуляцию - "обработку" антигена, его распознавание и клональную пролиферацию лимфоцитов - антиген - зависимую дифференцировку.

## **ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ**

Под противомикробными мероприятиями понимают совокупность методов уничтожения, подавления жизнедеятельности и ограничения миграции во внешней среде потенциально патогенных для человека микроорганизмов с целью предупреждения развития, лечения и распространения инфекционных болезней. Совокупность строго регламентированных и обязательных для выполнения противомикробных мероприятий в конкретных лечебных, детских или иных учреждениях и производствах носит название противомикробный режим.

К противомикробным мероприятиям, оказывающим прямое повреждающее действие на микробы, относят стерилизацию, дезинфекцию, антисептику и химиотерапию.

### **СТЕРИЛИЗАЦИЯ**

Под стерилизацией понимают совокупность физических или химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся форм патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов. В стерильных объектах допускается присутствие только термофильных бактерий, которые не размножаются при температуре тела человека и по-тому не представляют для него опасности.

Целями стерилизации являются:

1. предупреждение заноса микроорганизмов в организм человека при медицинских вмешательствах,
2. создание и поддержание асептической и безмикробной (гнотобиотической) среды,
3. исключение микробного обсеменения (контаминации) питательных сред, культур клеток, реактивов при микробиологических и иммунологических исследованиях,
4. предупреждение микробной биодеградации (разрушения) лекарственных, диагностических, продовольственных и иных материалов.

В медицинской практике стерилизации подвергают медицинский инструментарий и аппаратуру, лекарственные и диагностические препараты, перевязочный и шовный материал, бельё, предметы ухода за больными, питательные среды, лабораторную посуду; при создании гнотобиотической зоны - воздух помещения, оборудование и все остальные объекты зоны (боксы, палаты и др.).

Процесс стерилизации объектов состоит из следующих этапов:

- 1) дезинфекция, 2) очистка, 3) сборка, группировка, размещение в стерилизаторе, 4) собственно стерилизация, 5) сушка, 6) контроль за стерилизацией, 7) хранение стерилизованных материалов.

Стерилизующие агенты многообразны. Большинство объектов стерилизуют паром под давлением в специальных аппаратах (стерилизаторах, авто-claveах). В зависимости от стерилизуемых материалов температура насыщенного пара устанавливается от 110 до 138, давление - от 0,4 до 2,5 атм., экспозиция - от 3 до 60 мин. Наборы инструментов, текстильные изделия в свёртках, простые питательные среды стерилизуют при режиме 1 атм. (121) 15-30 мин. Чувствительные к температуре материалы стерилизуют при более низком давлении (0,4-0,5 атм.), устойчивые к ней - при более высоком (2,5 атм.). Стерилизация сухим жаром также высокоэффективна, но высокая температура (160-180), длительные сроки экспозиции (1-2 часа) и сухой горячий воздух могут вызвать повреждение стерилизуемых материалов. Поэтому сухим жаром стерилизуют предметы из термостабильных материалов (стекло, металл и др.), а также гидрофобные вещества. Термолабильные материалы

стерилизуют 3-4-кратным (дробным) прогреванием текучим паром при 100 по 1 часу с перерывами в 1 сутки, в течение которых материал находится в термостате (для прорастания спор).

Крупногабаритные изделия, предметы из термостабильных и разнородных материалов стерилизуют в герметических контейнерах парами формальдегида, этиленоксида, а также растворами формалинэтилалкоголя, формалин-низопропана при экспозиции в 6-24 часа (химическая стерилизация). В заводских условиях медицинские изделия, в основном одноразовые, часто стерилизуют гамма-лучами 0,2-4,5 М рад (лучевая стерилизация). Жидкости можно прорастить пропусканием через мелкопористые фильтры, воздух помещений - пропусканием через бактерицидные фильтры, а также многократным «промыванием» помещения ламинарным потоком стерильного воздуха.

Эффективность стерилизации проверяют бактериологическими методами.

## ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Под дезинфекцией понимают совокупность способов полного, частично-го или селективного уничтожения потенциально патогенных для человека микроорганизмов на объектах внешней среды с целью предупреждения передачи возбудителей болезней от больных и микроносителей здоровым людям.

Дезинфекция в очагах инфекционных заболеваний (квартира, дом, больничное, служебное помещение и др.) ставит цель селективного уничтожения возбудителя конкретной болезни, например, в очаге туберкулёза - возбудителя туберкулёза, дифтерии - возбудителя дифтерии, гепатита - возбудителя гепатита и т.д. Дезинфекции в этом случае подвергается та группа объектов, кото-рая служит фактором передачи возбудителя этой болезни. Она бывает заключительной, когда инфекционный больной госпитализируется в инфекционную больницу, и текущей, когда больной остается в очаге на какой-то период времени.

В больницах, детских, общественных учреждениях ежедневно или периодически проводится профилактическая дезинфекция, ставящая цель резкого снижения численности популяции всех потенциально патогенных для человека микробов на всех объектах помещения.

Дезинфицирующие средства разнообразны. В подавляющем большинстве случаев для целей дезинфекции используют химические вещества, кото-рые носят название дезинфектанты. Дезинфектанты должны обладать широким спектром действия, микробицидным эффектом, хорошо растворяться в воде и образовывать с ней или с воздухом стойкие активные растворы, суспензии, эмульсии, аэрозоли, туманы, обладать низкой токсичностью и аллергенно-стью, сохранять активность в обеззараживаемой среде, не повреждать обеззараживаемые объекты. В нашей стране чаще применяют 0,2-1% растворы хлорамина Б, 5% раствор кальция гипохлорита, 0,05-0,1% раствор диконита, 0,1-0,2% раствор сульфохлорантина, 3-6% раствор перекиси водорода, первомур, 3-5% раствор фенола и лизола, 1% раствор дегмина, 2-3% раствор формальдегида, смесь этилена и углекислоты (1:10).

Выбор дезинфектанта, его концентрации, лекарственной формы (раствор, аэрозоль, эмульсия, суспензия, порошок, паста, лаки, краски и др.), экспозиции (время действия) зависит от требуемой степени дезинфекции, спектра и уровня чувствительности микроба-возбудителя, вида дезинфекции, объекта дезинфекции, условий, в которых протекает процесс дезинфекции. Среди по-следних важное значение имеет температура рабочей формы дезинфектанта, которая должна быть не ниже 20 0С.

Дезинфекция должна сопровождаться выборочным бактериологическим и иным контролем.

Дезинфицирующий эффект может быть достигнут также с помощью сжи-гания объекта, прокаливания в пламени, воздействия горячего воздуха или па-ра в камерах, кипячения в воде, ультразвука, ультрафиолетового облучения, гамма-лучей, очистки, стирки, мытья, выколачивания, вытряхивания, протира-ния, проветривания.

## **АНТИСЕПТИКА**

Под антисептикой понимают совокупность способов уничтожения или подавления жизнедеятельности потенциально опасных для здоровья человека организмов на интактных или поврежденных коже, слизистых оболочках и в полостях с целью профилактики (профилактическая) и лечения (терапевтическая антисептика) инфекционных процессов.

Выделяют следующие категории профилактической антисептики: 1) антисептика свежих ран, 2) хирургическая антисептика рук, 3) гигиеническая антисептика рук, 4) антисептика операционного поля, 5) антисептика пупоч-ной раны, глазных инфекций, опрелостей и ссадин кожи новорожденных, 6) предупреждение послеродового мастита, микоза стоп и других инфекций кожи и слизистых оболочек.

Терапевтическая антисептика применяется с целью: 1) подавления жизнедеятельности микробов-воздбудителей местных инфекционных процессов и предупреждения сепсиса, 2) предупреждения повторного попадания микро-бов в патологический очаг и развития суперинфекции, реинфекции и вторич-ной инфекции.

Процесс антисептики состоит из следующих этапов: 1) очистка места нанесения антисептика от грязи, сала, сгустков крови, слизи, инородных ча-стиц, 2) хирургическая обработка (при антисептике ран), 3) внесение антисептического препарата, 4) изоляция обработанного антисептиком участка от повторного проникновения микробов.

Используемые для целей антисептики факторы называют антисептиче-скими средствами. Их подразделяют на: 1) химические антисептики, 2) биоло-гические антисептики (бактериофаги и препараты из бактерий-антагонистов), 3) физические и механические факторы (хирургическая обработка, промыва-ние, дренирование, сорбция и др.).

Антисептические препараты относятся к следующим классам химиче-ских веществ: хлор, йод и другие галогены; органические и неорганические кислоты; перекись водорода и перманганат калия; формальдегид и спирты; фенол и его препараты; тяжелые металлы; красители; катионные и анионные поверхностно-активные вещества; нитрофурановые, сульфаниламидные, 8-оксихинолиновые, хинолоновые, имидазольные и др. соединения.

Готовые лекарственные формы антисептиков, прежде всего, должны вы-зывать гибель (бактерицидный эффект) или задерживать рост и размножение (бактериостатический эффект) микробов и не должны оказывать повреждаю-щее действие на организм человека. Кроме того, к ним предъявляются требо-вания: не снижать противомикробную активность в присутствии патологиче-ских и физиологических субстратов, обладать достаточно широким спектром действия, хорошо растворяться в липидах, быть недорогими, экологически чи-стыми в производстве и стабильными при хранении.

Перед применением антисептика с целью лечения от больного выделяют воздбудитель болезни и определяют его чувствительность к антисептикам. При выборе антисептика для профилактической антисептики ориентируются на спектр и уровень естественной чувствительности микробов, которые обитают в месте нанесения антисептика.

В больничных стационарах в связи с широким распространением устойчивых к антибиотикам, антисептикам и дезинфициантам вариантов бактерий устанавливают систематический контроль за их распространением.

## **АСЕПТИКА**

Асептика - это совокупность противомикробных мероприятий, направленных на предупреждение развития инфекционного заболевания во время медицинских вмешательств или нарушении технологического процесса при микробиологических исследованиях и производстве различных материалов.

В медицинской практике асептические условия создаются при производстве хирургических вмешательств, приеме родов, эндоскопических процедурах, парентеральном введении лекарств и других медицинских вмешательствах, а также при больничном содержании лиц с высоким риском развития инфекции. Для этого инструментарий, перевязочный и шовный материал, инъекционные растворы, халаты, маски, перчатки, маски, дренажи и другие, со-прикасающиеся с раной объекты стерилизуют; руки лиц, принимающих участие в медицинском вмешательстве, операционное поле пациента подвергают антисептической обработке; воздух помещений, в которых проводят асептические мероприятия, и все, что в них находится, дезинфицируют; асептическая зона с помощью шлюзов или аналогичных приспособлений изолируется от смежных помещений.

В микробиологической практике асептика включает: 1) забор материала для исследования стерильным инструментарием и в стерильную посуду в условиях, исключающих его микробную контаминацию посторонней микрофлорой; 2) предупреждение контаминации материала во время его доставки в лабораторию; 3) использование стерильных петель, пипеток, питательных сред, посуды, реактивов и других объектов в процессе микробиологических исследований; 4) предупреждение контаминации микробных культур с рук, волос, одежды лабораторного работника, а также с нестерильных объектов внешней среды; 5) работу в стерильных боксах, ламинарном потоке стерильного воздуха, в зоне пламени спиртовки или газовой горелки. Несоблюдение указанных мер приводит к неправильному заключению о виде выделенной культуры и ее свойствах, что, в свою очередь, ведет к ошибочному диагнозу и неадекватным мерам терапии и профилактики.

## ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

### «Санитарно-бактериологический анализ воды»

Цель работы: провести оценку санитарно-бактериологического состояния воды, включающую 1) определение микробного числа водопроводной воды и воды открытых водоемов, 2) определение коли-титра и коли-индекса.

Посуда и материалы. Стерильная посуда - чашки Петри, пробирки, пи-петки на 1-2 и 5-10 мл, бутылки или флаконы (объем 500 мл). Стаканчики стеклянные термостойкие, колбы или флаконы емкостью 150-200 мл, палочки стеклянные, пинцеты, петли бактериологические, лупа, барометр, фильтровальная установка, микроскопы, бумага фильтровальная, стекла предметные и покровные.

Питательные среды: 0,85%-й раствор NaCl стерильный (или вода водо-проводная стерильная), МПА стерильный, полужидкая среда с глюкозой в пробирках по 7-10 мл, среда Эндо (сразу после приготовления разлить в 2-3 стерильные чашки Петри, дать застыть, завернуть чашки в бумагу и оставить в холодильнике), среда КОДА или среда Кесслера концентрированные и нор-мальной концентрации.

Реактивы. Свежеприготовленный раствор диметил-п-фенилендиамина, свежеприготовленный 3%-й раствор KOH, гипосульфит натрия, реактивы для окраски по Граму, фуксин, 70%-й этанол.

Отбор проб воды. Воду для санитарно-бактериологического исследования отбирают в количестве 500 мл в бутылки или флаконы, предварительно простерилизованные в бумажных пакетах, с ватно-марлевой пробкой. К горлышку бутылки привязывают пакетик с завернутой в него запасной пробкой.

Пробы воды из открытых водоемов, бассейнов, баков и т.п. отбирают с глубины 10-15 см, а при малой глубине – не менее 10-15 см от дна. Пробы из проруби берут на глубине 10-15 см от нижней поверхности льда. Пробы воды из исследуемого горизонта открытых водоемов (колодцев, бассейнов, озер, рек и пр.) отбирают с помощью батометров. После наполнения бутылки водой с заданной глубины ее извлекают из батометра и закрывают стерильной пробкой, сверху надевают бумажный колпачок.

Из водопроводных кранов воду отбирают следующим образом. Кран протирают тампоном, смоченным в спирте, обжигают, после чего 10-15 мин спускают воду. Затем отбирают приблизительно 400 мл воды. Заполненный флакон плотно закрывают стерильной резиновой или корковой пробкой, а сверху надевают бумажный колпачок. При проведении анализа хлорированной воды во флакон для отбора проб (емкость 500 мл) перед стерилизацией вносят дехлоратор – 10 мг гипосульфита натрия.

Бактериологическое исследование отобранных проб воды должно производиться не позднее 2 ч с момента отбора. В случае невозможности соблюдения этих сроков допускается проведение анализа воды не позднее чем через 6 ч при хранении пробы при температуре от 1 до 60С.

Определение микробного числа воды. С флаконов, содержащих пробу воды, снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют. Воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку.

Из каждой пробы делают посев не менее 2-х различных объемов, отобранных с таким расчетом, чтобы число выросших на чашках колоний колебалось от 30 до 300 (табл. 25).

Таблица 25. Рекомендуемые объемы воды для определения микроб-ного числа.

Тип исследуемой воды	Объем воды, мл
Водопроводная	1,0
Чистая	1,0 и 0,1
Слабо загрязненная	0,01 и 0,001
Сильно загрязненная	0,0001 и 0,00001

Для посева 0,1 мл и меньших объемов исследуемую воду разводят сте-рильной водой. Готовят последовательно десятикратные разведения, используя для каждого разведения стерильную пипетку. По 1 мл каждого разведения вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл рас-плавленного и остуженного до 45-500С МПА, который тщательно круговыми движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение 1 сут при 370С. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37 0С в течение суток, а другую – 2 сут при 200С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний (видимых невооруженным глазом и при увеличении в 2-5 раз) и вычисляют микробное число воды – количество микроорганизмов в 1 мл. Питьевая вода считается хорошей, если общее число бактерий в 1 мл не более 100; сомнительной – 100-500; загрязненной – 500 и более.

Определение коли-титра и коли-индекса воды. Коли-титр – мини-мальное количество воды (мл), в котором обнаруживаются БГКП. Коли-индекс – количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды (по международному и европейскому стандарту – в 100 мл). эти показатели определяют двух-этапным бродильным (титрационным) методом или методом мембранных фильтров.

Бродильный метод – основан на посеве определенных объемов анализируемой воды и подращивании при 370С в средах накопления с последующим высевом бактерий на плотную среду Эндо, дифференцировании выросших бактерий и определении наибольшего вероятного количества БГКП в 1 л воды по таблицам 26-27.

Таблица 26. Определение коли-индекса при исследовании воды.

Объем исследуемой воды (мл)				Коли-индекс	Коли-титр
100	10	1,0	0,1		
-	-	-	-	Менее 9	Более 111
-	-	+	-	9	111
-	+	-	-	10	105
+	-	-	-	23	43
+	-	+	-	94	10
+	+	-	-	230	4
+	+	-	+	960	1
+	+	+	-	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

При исследовании воды открытых водоемов, а также воды на этапах очистки и обеззараживания засевают 100,0; 10,0; 1,0 и 0,1 мл. для исследования водопроводной воды засевают три объема по 100,0 мл, три объема по 10,0 мл и три объема по 1,0 мл.

Указанные объемы воды помещают во флаконы или пробирки со средой Кесслера или КОДА, снабженные поплавками или комочками ваты, погруженными на дно сосуда. Посев 100,0 и 10,0 мл воды производят во флаконы и пробирки соответственно с 10,0 и 1,0 мл концентрированной среды; посев 1,0 и 0,1 мл воды в пробирки с 10,0 среды нормальной

концентрации. Посевы инкубируют 24 ч при 370С. Отсутствие помутнения и образования кислоты и газа во флаконах и пробирках позволяет получить отрицательный результат и закончить исследование.

Из каждого флакона или пробирки, в которых замечены помутнение, кислота, газ, делают посев петлей на поверхность среды Эндо, разделенной на 3-4 сектора. Посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы полу-чить изолированные колонии. Чашки инкубируют при 370С в течение 16-18 ч. При отсутствии роста, а также при наличии колоний, не характерных для БГКП (пленчатых, губчатых, с неровным краями и поверхностью, плесневых и др.), считают результат отрицательным.

Из выросших на среде Эндо красных, розовых, бледно-розовых колоний с металлическим блеском или без него (лактозоположительные колонии) делают мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, позволяющий дифференцировать БГКП от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudo-monadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. С этой целью 2-3 изолированные колонии снимают с поверхности среды стеклянной палочкой, наносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную раствором диметил-п-фенилендиадимида. При отрицательном оксидазном те-сте цвет бумаги не изменяется, при положительном - она окрашивается в синий цвет в течение 1мин.

Таблица 27. Определение коли-индекса при исследовании питьевой воды.

Количество положительных результатов анализов воды			Индекс
из 3-х флаконов по 100 мл	из 3-х пробирок по 10 мл	из 3-х пробирок по 1 мл	
0	0	0	Менее 3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	Более 1100

Наличие грамотрицательных палочек в мазках и отрицательный окси-дазный тест позволяют немедленно дать положительный ответ о наличии БГКП при анализе воды на

этапах очистки и воды открытых водоемов. При исследовании водопроводной воды грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном тесте, внося петлей посевной материал в полужидкий питательный агар с 0,5% глюкозы, и инкубируют при 370С в течение 1 суток. При наличии кислоты и газа получают положительный результат.

Результат анализа выражают в виде коли-индекса, величину которого определяют по табл. 7-8. Зная коли-индекс, рассчитывают коли-титр по фор-муле:

$$\text{coli-титр} = \frac{1000}{\text{coli-индекс.}}$$

### **«Санитарно-микробиологический анализ почвы»**

Цель работы: провести санитарно-бактериологическую оценку состояния почвы по результатам определения общего микробного числа, коли-титра, перфриганс-титра и количества термофильных бактерий.

Среды и материалы. Стерильная посуда – чашки Петри, пробирки, пи-петки, банки или пакеты. Нож, совок, колбы емкостью 500 мл, палочки стеклянные, пинцеты, петли бактериологические, вата, весы, микроскопы, стекла предметные и покровные.

Питательные среды. Эндо, Кесслера или КОДА, МПА, полужидкая среда с глюкозой, стерильное обезжиренное молоко или среда Вильсона-Блера, вода водопроводная стерильная.

Реактивы. Свежеприготовленный раствор диметил-п-фенилендиамина, свежеприготовленный 3%-й раствор KOH, гипосульфит натрия, реактивы для окраски по Граму, фуксин, 70%-й этанол.

Отбор проб и определение общего микробного числа. На обследуемой территории до 1000 м<sup>2</sup> выделяют 2 участка по 25 м<sup>2</sup>. Один должен быть расположен вблизи источника загрязнения (выгребные ямы, мусорные ящики и др.), а другой – в отдалении от них. На каждом участке намечают 5 точек – четыре по углам и одну в центре участка. Таким образом, отбирают 10 проб (из разных мест исследуемой территории). Почву берут стерильным ножом на глубине 10-15 см, образец массой 200-300 г помещают в стерильную банку или пакет и хорошо перемешивают. Следовательно, смешанный образец с каждого из 2-х выбранных участков должен иметь массу не менее 1 кг. Отобранные пробы анализируют в тот же день. Допускается хранение образцов почвы в лаборатории не более 12-18 ч при температуре 1-50С.

Из проб готовят навеску (30 г), которую вносят в колбу со стерильной водой (270 мл), и тщательно встраивают в течение 10 мин. Из полученной суспензии готовят 5 разведений: от 10<sup>-3</sup> до 10<sup>-7</sup>. По 1 мл из двух последних разведений вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-500С МПА, который тщательно круго-выми движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение суток при 370С. Затем подсчитывают число выросших колоний и определяют микробное число.

Определение коли-титра, перфриганс-титра и количества термофильных бактерий. Для определения коли-титра различные разведения почвенной суспензии засевают по 1 мл в пробирки с 5 мл среды Кесслера или КО-ДА и инкубируют при 370С в течение 24-48 ч. В дальнейшем анализ проводят по схеме, применяемой при определении коли-титра воды. Для посевов пользуются различными разведениями (чистую почву засевают от 1 г до разведения 10<sup>-3</sup>, загрязненную – от 10<sup>-3</sup> до 10<sup>-6</sup>). При анализе загрязненных почв можно провести

прямой поверхностный посев почвенной суспензии в количестве 0,1-0,5 мл в среду Эндо (разведения до 10-6).

Для определения перфрингенс-титра также используют разведение поч-венной взвеси (чистую почву засевают в разведении 10-1-10-3, загрязненную – от 10-4 до 10-6). По 1 мл из выбранных разведений засевают в пробирки с 5 мл стерильного обезжиренного молока или железосульфитной средой Вильсона-Блера, приготовленной ex tempore. Посевы инкубируют при 430С в течение 24-48 ч, после чего учитывают результаты по характерному свертыванию молока (образование губчатого сгустка в верхней части пробирки и просветление сыворотки) или по образованию колоний *Clostridium perfringens* в агаровом столбике среды Вильсона-Блера (колонии черного цвета различной интенсивности окраски, имеющие форму двояковыпуклой линзы, комочка ваты или «са-молетика»). Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр. Клетки *Clostridium perfringens* – подвижные (реже неподвижные) короткие толстые с закругленными концами. Образуют овальные или круглые эндоспоры, расположенные центрально и придающие клетке веретенообразную форму (споры также могут располагаться терминально или субтерминально). В мазках расположены одиночно, попарно, в виде цепочек или штакетообразных (параллельно друг к другу) скоплений, грамположительны, каталазоотрицательны. Предельное разведение почвенной суспензии, которое дает на молочной среде размножение *Clostridium perfringens*, означает титр этого микроорганизма в почве.

Для определения количества термофильных бактерий разведения полу-ченной суспензии (10-1, 10-2, 10-3) по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают рас-плавленным и остуженным МПА, тщательно перемешивают. Посевы инкубируют при 600С в течение суток, а затем подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 г почвы.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по комплексу показателей, из которых наиболее важным является степень фекального за-грязнения.

#### **«Санитарно-бактериологические исследования микрофлоры воздуха»**

Цель работы: провести санитарно-бактериологическую оценку состояния воздуха по результатам определения микробного числа с использованием седиментационного метода.

Среды и материалы: стерильные чашки Петри, МПА стерильный.

Проведение анализа. Две чашки Петри со стерильным МПА оставляют открытыми в течение 60 мин (чашки располагают на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека), после чего посевы инкубируют при 370С в течение 24 ч (в этих условиях развивается бактериальная флора). Затем чашки держат при 250С, что позволяет развиваться бактериям, требующим для своего роста более низких температур, и плесневым грибам. Подсчитывают суммарное число колоний, выросших на обеих чашках: при наличии менее 250 колоний воздух считается чистым; 250-500 колоний - за-грязненным в средней степени; при количестве колоний более 500 – загрязненным.

#### **«Санитарно-микробиологический контроль пищевых продуктов»**

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри; стерильные пробирки; стерильные пипетки на 1 – 2 мл и на 5 – 10 мл; петли бактериологические; скальпель; ступка фарфоровая с пестиком; бумага фильтровальная; вата; мик-роскопы; стекла предметные и покровные.

Питательные среды. 0,85 % раствор NaCl стерильный или водопровод-ная вода; МПА стерильный (для определения ОМЧ); среда Эндо; желточно-солевой (или молочно-солевой)

агар (для выявления *Staphylococcus aureus*) - сразу после приготовления разлить в стерильные чашки Петри, дать застыть, завернуть в бумагу и оставить в холодильнике; среда Сабуро (для выявления плесеней и дрожжей); 6,5 % солевой бульон (для определения наличия *Staphylococcus aureus*); среда Кесслера или КОДА (для обнаружения БГКП); среда Козера; среда Клиглера (для выделения бактерий рода *Salmonella*); селенито-вый бульон (для определения наличия бактерий рода *Salmonella*); висмут-сульфит агар (для выделения бактерий рода *Salmonella*); среда Вильсона-Блера (для определения наличия сульфатвосстанавливающих клостридий).

Реактивы. Свежеприготовленный раствор диметил-п-фенилендиамина, свежеприготовленный 3%-й раствор КОН, раствор перекиси водорода (30 г/дм<sup>3</sup>), реактивы для окраски по Граму, фуксии, 70%-й этанол.

Подготовка пищевых продуктов к исследованию. Перед исследованием пробы вначале подготавливают навеску, которая должна охарактеризовать всю исследуемую пробу. Навеску продукта берут стерильно из разных мест пробы – с поверхности и с глубины. Отбирают навеску 10 г, взвешивая на весах, растирают в стерильной фарфоровой ступке, постепенно добавляя 90 мл изотонического раствора хлорида натрия, и оставляют при комнатной температуре на несколько минут. Затем стерильной пипеткой с широким носиком отбирают взвесь для посевов и разведений. Принимается, что 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,1 г исходного продукта.

При исследовании кусковых продуктов образцы для анализа вырезают стерильным ножом в объеме (массе), необходимой для исследований в соответствие с нормативной документацией. У изделий с квадратной формой производят разрез к одной из граней. У изделий с прямоугольной производят разрез по продольной оси; у шарообразных изделий производят клинообразный разрез, направленный к центру.

Продукты жидкой консистенции перед отбором пробы тщательно перемешивают. Отбор производят стерильной пипеткой или металлическим половником. Отобранные образцы засевают и разводят для посевов без предварительной подготовки.

Перед отбором пробы сыпучих продуктов их тщательно перемешивают стерильной мешалкой или половником.

Пробы продуктов смешанной консистенции отбирают таким образом, чтобы в образец входили все компоненты в соотношении, соответствующем их содержанию в продукте.

Продукты, имеющие кислую реакцию (рН 4,0-6,0), перед исследованием нейтрализуют стерильным 10 % раствором двууглекислого натрия для сла-бощелочной реакции (рН 7,2-7,4). Реакцию среды проверяют по универсальной индикаторной бумаге.

Для исследования на наличие сальмонелл из усредненной пробы отбирается отдельная навеска массой 25 г.

Приготовление разведений пищевых продуктов для посева. Для продуктов жидкой консистенции разведения готовят следующим образом: отбирают стерильной пипеткой 1 мл продукта и вносят в пробирку, содержащую 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, тщательно перемешивают. Полученное разведение (10-1) подвергают таким же образом дальнейшему разведению в необходимое количество раз (кратное 10).

При исследовании плотных продуктов в качестве первого разведения используют 10 % взвесь, полученную способом, описанным выше.

Определение общей обсемененности. Выбранные для посева разведения вносят по 1 мл (каждого разведения) в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и охлажденного до 40-45°C МПА, который тщательно, круговыми

движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение суток при 370С, после чего подсчитывают число выросших колоний. Определяют общее число бактерий в 1 мл или 1 г продукта.

Таблица 28. Разведения для определения общего числа бактерий при посеве молока и некоторых молочных продуктов.

Продукт	Засеваемые разведения
Молоко и сливки сырье	$10^{-4}$ - $10^{-6}$
Молоко и сливки пастеризованные	$10^{-1}$ - $10^{-3}$
Мороженое, коктейли молочные	$10^{-1}$ - $10^{-3}$
Молоко сгущенное с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком	$10^{-1}$ - $10^{-3}$
Плавленый сыр	$10^{-1}$ - $10^{-2}$

Определение наличия плесеней и дрожжей. Выбранные для посева разведения вносят по 1 мл (каждого разведения) в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленной и остуженной до 45-500С сре-ды Сабуро, которую тщательно, круговыми движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение 5 сут при 250С, после чего подсчитывают число выросших колоний. Определяют общее количество дрожжей и плесневых грибов в 1 мл или 1 г продукта.

Определение наличия БГКП. Для посева используется то количество продукта, в котором в соответствии с установленными нормами предусматривается отсутствие БГКП. Из выбранных разведений исследуемых образцов продуктов берут по 1 мл и засевают в пробирки со средой Кесслера (в 2-х по-вторностях). Засеянные пробирки инкубируют при 370С в течение 24 часов. При отсутствии признаков роста (газообразование, изменение цвета среды) делают заключение о соответствии исследуемого продукта нормативу. При наличии признаков роста производят посев на среду Эндо. Посевы инкубируют 18-20 часов при 370С. При просмотре посевов отмечают колонии, подозрительные или типичные для БГКП (образуют красные, розовые, бледно-розовые колонии с металлическим блеском или без него). Из них делают препараты живых и фиксированных клеток, окрашивают по Граму, микроскопируют. Обнаружение грамотрицательных, не образующих спор палочек с закругленными концами, свидетельствует о возможном наличии БГКП.

При необходимости проводят оксидазный тест и высев на полужидкую среду с глюкозой, среду Козера. БГКП оксидазоотрицательны, большинство видов сбраживают глюкозу с образованием органических кислот, некоторые виды также выделяют газ, цитрат не утилизируют. Сопоставляя полученные данные, делают вывод о наличии БГКП в исследуемом образце.

Определение наличия бактерий рода *Salmonella*. Определение сальмонелл проводят в навеске продукта 25 г. Производят посев навески в 100 мл селенитового бульона. Посев инкубируют 24 ч при 370С. Затем производят высев истощающим штрихом на поверхность висмут-сульфит агара, инкубируют 24 ч при 370С. Изолированные колонии, характерные для сальмонелл (черные, с характерным металлическим блеском, с прокрашиванием участка среды под колонией в черный цвет; некоторые серовары образуют нежные светло-зеленые или крупные серовато-зеленые колонии), пересевают на среду Клиглера штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик. Посевы помещают на 12-16 ч в термостат с температурой 370С. Вид *Salmonella* сбраживает глюкозу с образованием кислоты и газа,

подавляющее большинство не сбраживают лактозу (кроме представителей 2-х видов). Для дальнейшей предварительной идентификации готовят препараты живых и фиксированных клеток, окрашивают по Граму. К бактериям рода *Salmonella* относят палочки с закругленными концами, в большинстве подвижные, не образующие спор и капсул, грамотрицательные, оксидазоотрицательные.

Делают вывод о возможном наличии сальмонелл в исследуемом образце. Подробно полная схема идентификации сальмонелл описана в специальных руководствах по медицинской микробиологии.

Определение наличия *Staphylococcus aureus*. Из выбранных разведенений исследуемых образцов продуктов берут по 1 мл и засевают в пробирки с 5 мл 6,5 % солевого бульона. Кроме того, основную 10 % взвесь продукта в количестве 0,2 мл наносят на поверхность желточно-солевого или молочно-солевого агара и тщательно растирают шпателем. Посевы инкубируют 18-20 ч при 37°C. Чашки с плотными средами оставляют еще на сутки при комнатной температуре (для проявления пигмента).

Просматривают посевы на плотных средах. Из подозрительных колоний делают препараты, окрашивают по Граму. Проверяют наличие каталазы.

Колонии *Staphylococcus aureus* гладкие, выпуклые, мутные диаметром около 4 мм. Бактерии синтезируют желтый пигмент, цвет колоний варьирует от белого до оранжевого. На бульоне стафилококки сначала вызывают его равномерное помутнение, а затем образуют рыхлый хлопьевидный осадок.

*Staphylococcus aureus* – неподвижные кокки, расположенные одиночно, парами или грядьями. Грамположительны, каталазоположительны, обычно оксидазоотрицательны.

Из пробирок с солевым бульоном делают высея на желточно-солевой (колонии имеют форму плоских дисков диаметром 2-4 мм, белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды) или молочно-солевой (мутные, круглые, ровные, выпуклые колонии белого, кремового, желтого или оранжевого цвета 204 мм в диаметре) агар, проводят предварительную идентификацию как описано выше.

Делают вывод о возможном наличии *S. aureus* в исследуемом образце. Полную схему идентификации золотистого стафилококка можно найти в специальных руководствах.

Определение наличия *Proteus*. Для выделения бактерий рода *Proteus* производят посев по методу Шукевича: 0,5 мл взвеси продукта засевают в конденсационную воду свежескошенного МПА. Посевы инкубируют 18-20 ч при 37°C. Если на скошенном МПА наблюдается вползающий нежный вуалеобразный рост, сопровождающийся специфическим запахом, то из верхнего края выросшей культуры готовят препараты, окрашивают по Граму, выявляют подвижность.

К *Proteus* относят прямые, подвижные (иногда встречаются неподвижные формы, лишенные жгутиков) палочки с закругленными концами, не образующие спор и капсул. Клетки склонны к плеоморфизму, наблюдаются кокко-видные и нитевидные формы. Грамотрицательны, каталазоотрицательны, оксидазоотрицательны.

Делают вывод о наличии бактерий рода *Proteus* в исследуемом образце.

Определение наличия сульфитвосстановливающих клоストридий. Из выбранных исследуемых образцов продуктов берут по 1 мл и засевают в пробирки с 9 мл расплавленной и охлажденной до 45°C средой Вильсона-Блера, тщательно перемешивают. Посевы инкубируют 18-20 ч при 37°C. Появление в среде черных колоний указывает на присутствие сульфитвосстановливающих клостродий. Из подозрительных колоний готовят

препараты, окрашивают по Граму. Проверяют наличие каталазы с помощью раствора перекиси водорода (30 г/дм<sup>3</sup>).

Делают вывод о возможном наличии сульфитвосстанавливающих кло-стридий в исследуемом образце.

### **«Санитарно-микробиологический контроль консервов»**

Бактериологическое исследование готовых консервов проводится по ГОСТ 30425-97 «Консервы. Метод определения промышленной стерильности», ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов».

Анализ готовой продукции проводится лабораториями центров Гос-санэпиднадзора, как правило, с целью установления промышленной стерильности консервов.

По эпидемиологическим показаниям консервы исследуют для выявления патогенной и токсигенной микрофлоры.

Кроме того, консервы исследуют для выяснения причин возникновения порчи (выявление возбудителей порчи).

Консервированные продукты, удовлетворяющие требованиям промышленной стерильности, не должны представлять опасность для здоровья потребителя и не должны портиться во время хранения.

Готовые консервы не должны содержать патогенных микробов и иметь признаков порчи, обусловленных жизнедеятельностью микробов.

#### **Отбор проб для исследования (ГОСТ 26668-85)**

Проводят внешний осмотр банок. Отмечают наличие ржавчины, деформации, подтеков. В журнале записывают маркировку жестяных банок, со стеклянных банок отклеивают этикетку. Тщательно моют банки теплой водой с мылом, насухо обтирают.

Проверяют герметичность банок. Для этого в эксикатор наливают свежеприготовленную в течение 15 с и охлажденную до 40-45°C воду, опускают на дно эксикатора банки и наблюдают за пузырьками воздуха. Негерметичной считается банка, у которой из одного и того же места выходит струйка воздуха или периодически несколько пузырьков.

Негерметичные банки бактериологическому исследованию не подлежат. Герметически упакованные, бездефектные по внешнему виду консервы подвергаются термостатной выдержке до 10 дней при 30-55°C в зависимости от консервов для проверки на бомбаж. О наличии бомбажа судят по вздутию дна или крышки банки.

Вскрытие банки и посев консервов производят при строгом соблюдении правил асептики (в боксах).

#### **Исследование консервов на аэробы и анаэробы**

В подозрительных консервах при наличии кольца на границе продукта с тарой или осадка на дне банки навески отбирают без предварительного перемешивания продукта для того, чтобы в навеску попала часть осадка или кольца.

Масса или объем навески продукта должны составлять для высея в две пробирки с жидкой питательной средой - 2 г или 2 см<sup>3</sup> при выявлении аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов.

После отбора навесок продукта консервы сохраняют до окончания анализа и оформления результатов при температуре 4 + 2°C в условиях, исключающих их повторное заражение микроорганизмами. Если в посевах будут выявлены жизнеспособные

микроорганизмы, то при необходимости отбирают до-полнительные навески продукта для высе-ва в питательные среды с целью количественного подсчета обнаруженных микроорганизмов.

Для выявления жизнеспособных мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ГОСТ 10444.3-85) в каждую из двух проби-рок, содержащих по 5-6 см<sup>3</sup> жидкой питательной среды (МПБ), вносят по 1 г или 1 см<sup>3</sup> консервированного продукта. Сразу после посева на поверхность жидкой питательной среды насыпают вазелиновое масло или парафиновую смесь слоем около 2 см.

Посевы термостатируют при температуре  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  не менее 5 суток с ежедневным наблюдением за появлением признаков развития микроорганизмов: помутнение среды, образование пленки, газа, осадка.

По мере необходимости из посевов отбирают культуральную жидкость для проведения исследований.

Принадлежность к термофильным аэробным и факультативно-анаэробным микроорганизмам устанавливают по изменению цвета среды, если она содержит индикатор-бромкрезоловый пурпурный, морфологии клеток, наличию спор, отношению к окраске по Граму, каталазной активности.

Схема проведения анализа консервов на промышленную стерильность (ГОСТ 30425-97)

Осмотр, регистрация, санитарная обработка

Проверка герметичности

Термостатирование консервов

Определение внешнего вида консервов после термостатирования

Высев продукта в питательные среды,

Термостатирование посевов

Определение pH продукта

Микроскопирование продукта

Фиксирование признаков роста микроорганизмов

Проба на каталазу

Микроскопирование посевов, определение спорообразующей способности микроорганизмов

Определение группы, семейства, рода или вида микроорганизмов, отсутствие микроорганизмов, опасных для здоровья потребителя.

Оценка промышленной стерильности консервов.

«Санитарно-бактериологическое исследование молока»

Микрофлора свежего сырого молока разнообразна. В нем обнаруживаются молочно-кислые, масляно-кислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек, гнилостные бактерии и энтерококки, дрожжи. Среди них имеются микроорганизмы, вызывающие изменение белковых веществ и жира молока, его цвета (посинение, покраснение), консистенции. Могут встречаться возбудители различных инфекционных заболеваний (дизентерии, бруцеллеза, туберкулеза, ящура) и пищевых отравлений (золотистый стафилококк, сальмонеллы). В молоке, хранящемся при температуре ниже 8-100C, большинство млечно-кислых бактерий практически не размножаются, что способствует развитию холдоустойчивых (психрофильных) бактерий, преимущественно рода *Pseudomonas*, которые способны вызывать разложение белков и жира<sup>4</sup> при этом молоко приобретает горький вкус. Прогоркание сырого молока вызывают также бактерии рода

Alcaligenesi споровые бактерии *Bacillus cereus*. Установлено, что органолептические показатели качества молока изменяются при со-держании в 1 см<sup>3</sup> молока бактерий в количестве 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> клеток.

Цель работы: освоить методы санитарно-бактериологического анализа молока.

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки на 1-2 и на 5-10 мл, салфетки марлевые 5x5 (или ватный тампон на палочке).

Среды и реактивы: МПА стерильный; изотонический раствор NaCl (1:10, 1:100, 1:1000); среда Булира; раствор метиленового голубого; ЮЮ014 5 раствор резузарина.

Для определения микробного числа пастеризованного молока готовят десятикратные разведения, используя стерильный изотонический раствор NaCl (1:10, 1:100, 1:1000), и по 1 мл каждого разведения вносят в стерильные чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным МПА или РПА. Посевы инкубируют при 370С в течение 24 ч., после чего подсчитывают количество выросших колоний.

Количество микроорганизмов в 1 мл продукта определяют по формуле:

$$N = a \cdot 10^n / V,$$

где N – количество микроорганизмов (кл/мл),

a – количество выросших колоний,

n – порядковый номер разведения, из которого сделан посев;

V – количество мл разведения, взятое для посева.

Пастеризованное молоко группы А должно содержать не более 5·10<sup>4</sup> кл/мл, группы Б – не более 10<sup>5</sup> кл/мл.

Для непастеризованного молока ГОСТ предусматривает определение общей численности обсемененности косвенно по редуктазной пробе. В молоке содержатся различные ферменты, в том числе и редуктаза (анаэробная дегид-рогеназа, передающая водород от окисляемого субстрата ряду органических или неорганических соединений, но неспособная передать его кислороду воздуха). Редуктаза накапливается в молоке, главным образом, при размножении в нем анаэробных микроорганизмов, поэтому количество редуктазы в молоке является косвенным показателем его бактериальной обсемененности. Обнаруживается редуктаза по обесцвечиванию красителей (метиленовый синий или резазурин) в процессе их восстановления. Свежее молоко восстанавливает красители медленно, с увеличением числа бактерий в молоке скорость восстановления возрастает. По скорости восстановления красителя примерно определяют численность бактерий и степень загрязнения молока.

Редуктазная проба с метиленовым голубым. В стерильную пробирку наливают 1 мл раствора метиленового голубого и 10 мл исследуемого молока, предварительно нагревшего до 38-400С. пробирку закрывают резиновой пробкой, перемешивают ее содержимое и ставят в водяную баню или термостат при 38-400С. Изменение окраски отмечают через 10 мин., 1 час и 3 часа. Одновременно ставят следующие контроли:

- 1) исследуемое молоко 10 мл и дистиллированная вода 1 мл;
- 2) кипяченое исследуемое молоко 10 мл и метиленовый голубой 1 мл (отрицательный контроль).

Проба на редуктазу считается законченной, когда наступает полное обесцвечивание молока. Для оценки результатов используют результаты табл. 29.

Таблица 29. Оценка качества молока по редуктазной пробе с мети-леновым голубым.

Скорость обесцвечивания	Примерное количество микробов в 1 мл молока	Оценка качества молока	Класс молока
До 10 мин	$2 \cdot 10^7$ и выше	Очень плохое	IV
10 мин – 1 час	$0,4-2,0 \cdot 10^7$	Плохое	III
1 – 3 часа	$0,5-4,0 \cdot 10^6$	Удовлетворительное	II
Свыше 3 час	менее $0,5 \cdot 10^6$	Хорошее	I

Редуктазная проба с резазурином. В стерильную пробирку наливают 10 мл анализируемого молока, предварительно подогретого до 38-40°C, 1 мл 0,014 % водного раствора резазурина, тщательно перемешивают и помещают на водяную баню при 38-40°C. Изменение окраски учитывают через 20 мин и 1 час. Для оценки результатов используют показатели, представленные в табл. 30.

Определение общего количества бактерий в молоке. Вначале готовят разведения (10-1-10-9), для чего из отобранный пробы молока стерильной пи-петкой берут 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Затем при глубинном посеве из разведений молока, обесцвечивающегося с резузарином менее чем через 20 мин, т.е. разведений 10-4; 10-5 и 10-6, берут отдельной стерильной пипеткой по 1 мл суспензии и вносят в стерильные чаш-ки Петри в двух- и трекратной повторности.

При обесцвечивании молока с резазурином более чем через 20 мин по-сев делают из разведения 10-3; 10-4 и 10-5. В чашки с суспензией вносят рас-плавленный и охлажденный до 45-50°C МПА. Суспензию с агаром перемешивают и чашки Петри с посевом помещают в термостат при 28-30°C. После 2-х дневной инкубации подсчитывают колонии бактерий в чашках. Количество дрожжей и плесневых грибов подсчитывают на 4-й день. Число колоний умножают на степень разведения и определяют среднее арифметическое их число.

Таблица 30. Оценка качества молока по редуктазной пробе с резазу-рином.

Окраска молока	Продолжительность изменения цвета, час	Примерное количество микробов в 1 мл молока	Оценка качества молока	Класс молока
Сине-стальная	1	менее $0,5 \cdot 10^6$	Хорошее	I
Фиолетовая или сиреневая	1	$0,5-4,0 \cdot 10^6$	Удовлетворительное	II
Розовая или белая	1	$0,4-2,0 \cdot 10^7$	Плохое	III
Белая	0,3	более $2 \cdot 10^7$	Очень плохое	IV

Определение титра кишечной палочки (*Escherichia coli*). При оценке качества молока определение титра имеет важное значение, т.к. кишечная па-лочка – обитатель кишечника человека и животных и ее присутствие в молоке указывает на фекальное загрязнение молока.

Для выявления кишечной палочки и определения ее титра в молоке используют газообразующую способность группы бактерий *E. coli-aerogenes* на жидкой среде Булира следующего состава: МПБ – 1000 мл; манит – 10 г; NaCl – 5 г.

Насыщенным раствором соды устанавливают нейтральную реакцию среды, затем подкрашивают ее насыщенным водным раствором нейтральрота до вишнево-красного цвета, фильтруют, разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм.

В пробирки со средой Булира вносят по 1 мл супензии из соответствующего разведения. Посев проводят из всех разведений в двух- и трехкратной повторности. Пробирки с посевами выдерживают при 420С в течение 48 ч.

В связи с тем, что в пробах молока могут быть другие бактерии, сбраживающие лактозу с образованием газа, точно установить наличие кишечной палочки можно, сделав посев из забродившей жидкости на специфическую среду Эндо. Если бродильная проба положительная и культура на среде Эндо дает ярко-красные колонии, то в исследуемом субстрате присутствуют кишечные палочки. Для полной идентификации нужны дополнительные данные: об отсутствии разложения желатины, об отсутствии газа и кислоты при выращивании на сахарозе и об образовании скатола и индола в МПБ.

Коли-титр молока можно определить на среде Кесслера, в состав которой входят желчь, краситель генциановый фиолетовый – вещества, подавляющие рост молочнокислых и других грамположительных бактерий.

Молоко или молочные продукты вначале разводят в соотношении 1:10, 1:100 и т.д. Затем берут 6 пробирок со средой Кесслера, в три из них вносят по 1 мл, в остальные – по 0,1 мл каждого разведения. Засеянные пробирки ставят на 2 сут в термостат при температуре 43 0С. отсутствие газообразования во всех 6 пробирках указывает на чистоту продукта, и при этом принято считать, что его коли-титр выше 3 мл; при газообразовании в одной пробирке, засеянной 1 мл исследуемого продукта, коли-титр равен 3 мл; при образовании газа более чем в одной пробирке с 0,1 мл разведения молока коли-титр считается равным 0,3 мл. Такое молоко не пригодно к употреблению. При образовании газа в 6 или 5 пробирках с 0,1 мл разведения молока (очень загрязненное молоко) – коли-титр менее 0,3 мл.

Идентификацию кишечной палочки в этом случае также проводят на среде Эндо, для чего высевают на нее супензию из газообразующих пробирок и ставят их на 1 сут в термостат при температуре 370С.

На основании определения титра кишечной палочки качество молока подразделяют на классы (табл. 31).

Таблица 31. Определение качества молока по коли-титру.

Показатель	Класс			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Коли-титр	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Качество молока	Хорошее	Среднее	Плохое	Очень плохое

Определение в молоке количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий. При оценке качества молока (согласно требованиям ГОСТ 25102-82) необходимо определить в нем количество спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий. Иногда при нормальной кислотности молоко может быть обильно обсеменено спорами маслянокислых бактерий, которые выдерживают пастеризацию. Развитие лактатсбраживающих маслянокислых бактерий особенно опасно в сыре, так как они вызывают его всучивание на поздних этапах созревания вследствие выделения большого количества газов СО2 и Н2. образование масляной кислоты придает сырье прогорклый вкус и делает его абсолютно непригодным для реализации или резко снижает его качество.

Метод определения количества спор лактатсбраживающих анаэробных бактерий в молоке основан на способности анаэробных бактерий развиваться и давать видимые

признаки роста – разрывы среды – в посевах прогретого мо-лока в пробирках с плотной питательной среды после выдерживания его в течение 3 сут при температуре 37 0С.

Производят посев 1 мл исследуемого образца молока и его разведений в пробирки с 10 мл питательной среды, прокипяченной перед анализом в течение 30 мин и охлажденной до 400С. Каждый образец исследуемого молока из выбранных разведений засевают в 2 пробирки с мясо-пептонной или лактатной средой, внося посевной материал на дно пробирки и не взбалтывая ее со-держимое. Сверху посевы заливают слоем в 1,5-2 см расплавленного и предварительно охлажденного до 450С агара. Пробирки помещают в термостат при 37 0С на 7 час.

При приготовлении мясо-пептонной среды к 900 мл МПБ добавляют 5 г лактата, 15 г ацетата натрия, 0,8 г хлорида цистеина, 40 мл дрожжевого авто-лизата или 4 г сухого дрожжевого автолизата и 20 г агара. Смесь нагревают до 950С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агара и добавляют 10 мл 0,01 % водного раствора тетрабората натрия и 1 мл 0,4 % водного раствора индикатора нейтрального красного. При помощи 20 % водного раствора молочной кислоты устанавливают pH 5,7. приготовленную среду разливают в пробирки по 10 мл, закрывают ватными пробками и стерилизуют 20 мин при температуре 1150С, затем ватные пробки заменяют стериль-ными резиновыми.

Допустимо использовать в анализе упрощенную среду следующего со-става: МПБ – 1000 л; лактат кальция – 6,5 г; агар – 20 г; 0,4 % водный раствор индикатора нейтрального красного – 1 мл; pH 5,7. стерилизуют среду при 0,5 атм 20 мин.

Наличие спор анаэробных лактатсбраживающих бактерий определяют по разрывам агарового столбика вследствие выделения газа и по изменению красного цвета питательной среды на соломенно-желтый.

Наиболее вероятное число (НВЧ) спор вычисляют по количеству про-бирок, в которых они дали рост (табл. 32).

Результаты опытов, в которых количество пробирок с видимыми при-знаками роста маслянокислых бактерий при посевах 1; 0,1; 0,01 мл молока, составляет 002, 012, 021, 022, 102, 112, 122, 202, не могут быть использованы для расчета, так как в 95 % случаев они вызваны несовершенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. При таких результатах исследование молока надо повторить.

По результатам исследований делается вывод о качестве исследуемого продукта. Нормативные показатели по показателям санитарно-гигиенической оценки молока и молочных продуктов приведены выше (см. табл. 13).

Таблица 32. Определение вероятного числа спор лактатсбраживаю-щих анаэробных бактерий в молоке.

Количество пробирок с положительными результатами при разных объемах посевного материала			НВЧ спор в 1 мл	Количество пробирок с положительными результатами при разных объемах посевного материала			НВЧ спор в 1 мл
1 мл	0,1 мл	0,01 мл		1 мл	0,1 мл	0,01 мл	
0	0	0	0,0	1	1	2	-
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	-	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	-
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	-	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	-

0	2	1	-	2	1	0	6,0
0	2	2	-	2	1	1	1,3
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	-	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0 и более
1	1	1	0,2				

## «Микробиологический анализ сыра»

Цель работы: освоить методы санитарно-бактериологического анализа сыра.

### Материалы и оборудование

Свежий сыр (например, голландский), предметные стекла, метиленовый синий, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

В основе сыротделения лежат сложные биохимические процессы, основная роль в которых принадлежит молочнокислому и про-пионовокислому брожению. Большое влияние на качество готового продукта оказывает качество молока и прежде всего степень обсемененности его нежелательными микроорганизмами.

В сырной массе, кроме заквасочной микрофлоры, содержатся представители остаточной микрофлоры пастеризованного молока и микроорганизмы, попавшие извне. Это бактерии группы кишечных палочек, гнилостные, молочно-кислые, мезофильные и термофильные, молочно-кислые стрептококки и палочки, микрококки, дрожжи.

Свертывание молока (коагуляцию казеина) проводят, заквашивая его молочнокислыми бактериями и вводя сычужный фермент. Такие сыры называются сычужными. Сыры, в созревании которых участвуют только молочно-кислые бактерии, называют кисломолочными.

По степени разложения казеина сычужные сыры делят на твердые и мягкие. Твердые сыры, в свою очередь, делят на крупные (швейцарский, советский) и мелкие (голландский, костромской и др.).

Крупные сыры имеют более длительный период созревания (6-9 мес.), чем мелкие (1-2 мес.), в процессе их приготовления участвуют преимущественно молочнокислые палочки *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, в меньшей степени - молочнокислые лактобактерии *Lactococcus lactis* и ароматообразующие лакто-кокки.

В закваску для крупных сыров наряду с молочнокислыми бактериями включают и пропионовокислые палочки. Стадия пропионовокислого брожения следует за стадией молочнокислого брожения и сопровождается накоплением летучих кислот - пропионовой, уксусной и диоксида углерода, образующихся при сбраживании лактатов. Выделение диоксида углерода обусловливает появление рисунка сыра - так называемых глазков. В мелких сырах глазки образуются в первые дни ферментации в процессе жизнедеятельности ароматообразующих лактобактерий.

Свойства сыра - вкус, аромат, консистенция, рисунок - формируются как результат сложных биохимических процессов, главная роль в которых принадлежит микроорганизмам, внесенным в сырную массу с закваской.

Наличие микроорганизмов в сыре может служить и причиной различных его пороков. Раннее вслучивание сыров вследствие образования большого количества газов (CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>) вызывают бактерии группы кишечной палочки в период, когда в сыре еще недоиспользована лактоза. Позднее вслучивание вызывают маслянокислые бактерии рода

*Clostridium*, сбраживающие молочную кислоту в маслянную с выделением CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>. Изъязвление корки сыра могут вызывать плесневые грибы.

При полном анализе сыра проводят количественное определение микрорганизмов методом посева на агаре с гидролизованным молоком измельченной и растертой при подогреве до 45°C пробы сыра.

**Метод отпечатков.** При изучении микрофлоры сыра можно также использовать метод отпечатков, дающий возможность охарактеризовать естественное расположение микроорганизмов в сыре.

Этот метод заключается в следующем. Сначала у взятого для исследования свежего сыра фламбированным ножом срезают то место, где будет взята пробы. Затем срезают тонкий кусочек сыра, кладут его между двумя сухими чистыми предметными стеклами и сдавливают ими. Затем стекла осторожно разъединяют и сыр удаляют. Полученный на стекле отпечаток сушат вдали от пламени, фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1) и окрашивают метиленовым синим. При микроскопировании крупных сыров выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопировании мелких сыров - молочнокислые лактобактерии.

### **«Микробиологический анализ сливочного масла»**

Цель работы: освоить методы санитарно-бактериологического анализа сливочного масла.

#### **Материалы и оборудование**

Образцы сливочного масла свежего и несвежего, водяная баня, банки с притертными пробками, стерильные пипетки, стеклянные стаканы, составляющие элективных сред (МПА, агар с гидролизованным обратом и мелом, сусло-агар со стрептомицином, среда Кесслера), центрифуги, лупы, метиленовый синий, фильтровальная бумага, горелки, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Сладкосливочное масло готовят из пастеризованных сливок, которые не заквашиваются. По технологии приготовления масла этого типа присутствие микрофлоры нежелательно: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Снижения численности микрофлоры достигают пастеризацией сливок с после-дующей упаковкой и хранением масла при низких температурах (-20°C), а также надлежащим уходом за оборудованием. Загрязнение масла возможно из-за недоброкачественной воды, используемой для его промывания. В 1 мл свежего сладкосливочного масла содержится 50 000-100 000 клеток бактерий.

Технология кислосливочного масла основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. После пастеризации в сливки вносят закваску, состав микрофлоры которой важен для повышения прочности (устойчивости при хранении) и аромата масла. В состав закваски входят *Lac-tococcus lactis*, *L. cremoris* и ароматобразующие бактерии: *L. diacetilactis*, *L. citrovorum* и *L. paracitrovorus*. В 1 мл кислосливочного масла содержится от 1 до 10 млн бактерий.

Масло для учета численности микроорганизмов берут стерильным щупом из 2-3 мест по 10-15 г и помещают в стерильные банки с притертными пробками. При исследовании на плесневые грибы делают соскобы с поверхности масла, особенно с тех мест, где простым глазом или в лупу виден мицелий гриба.

Перед исследованием пробу масла расплавляют в банке на водяной бане, нагретой до 40-50°C. Из расплавленного масла после тщательного перемешивания стерильной пипеткой

берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, подогретой до 400С. Из полученного таким образом разведения 10-1 готовят все последующие (10-2; 10-3; 10-4; 10-5). Из соответствующих разведений делают посев на элективные среды: для учета общего количества бактерий - на агар с гидролизованным молоком или МПА, для учета протеолитических бактерий - на молочный агар, молочнокислых бактерий - на агар с гидролизованным обратом и мелом, дрожжей - на сусло-агар со стрептомицином, для определения бродильного титра - на среду Кесслера.

Для микроскопического исследования берут кислосливочное свежее и несвежее масло. Его плавят в стеклянном стакане на водяной бане при температуре 400С, перемешивают, наливают в центрифужную пробирку и центрифицируют 10 мин. Верхний слой сливают, из осадка готовят препарат. Мазок прогревают на пламени горелки и обезжирают, прикладывая к неостывшему мазку фильтровальную бумагу. Окрашивают метиленовым синим в течение 2-3 мин.

В свежем кислосливочном масле присутствуют молочнокислые лакто-кокки, в несвежем масле - наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесневые грибы и гнилостные бактерии.

По результатам готовят заключение о качестве исследуемого сливочного масла. Нормативные показатели представлены выше (табл. 15).

### **«Микробиологический анализ мяса»**

Цель работы: освоить методы санитарно-бактериологического анализа мяса.

#### **Материалы и оборудование**

Пробирки с МПА, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, мясо свежее и несвежее, водяная баня, ножи, скальпели, шпатели Дригальского, пробирки со стерильной водой, фуксин, спирт с эфиром, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

Мясо здорового скота можно считать практически свободным от микроорганизмов. Мясо павших больных и переутомленных животных содержит аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Бактерии, попавшие на поверхность мяса, постепенно проникают вглубь него. Скорость проникновения зависит от температуры окружающей среды и вида микроорганизмов. В мясо, охлажденное до 2-4°С, бактерии проникают через 30 дней в среднем на глубину 1 см. Проникновению микроорганизмов препятствует образующаяся в результате подсыхания мяса корочка. При хороший корочке туша может храниться при 0°С около 8 недель.

После убоя скота происходят изменения в мышечной ткани, наступает период созревания мяса, характеризующийся сложными физико-химическими процессами. При распаде гликогена в мышечной ткани накапливается молочная кислота, а в результате распада АТФ - фосфорная кислота. Для завершения созревания мяса требуется обычно несколько дней.

Если мясо хранить при температурах, благоприятных для развития микроорганизмов, в нем начнутся микробиологические процессы. Преобладающей микрофлорой в гниющем мясе становятся гнилостные палочки. Примерно через 3-4 сут в глубине мяса начинают размножаться и анаэробы (*Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* и др.). Даже в мясе клинически здоровых животных иногда обнаруживают болезнетворные микроорганизмы, которые вызывают мясные отравления (пищевые токсициоинфекции). Часть их содержится в кишечнике животных и в момент убоя.

В случае убоя животных, больных сибирской язвой, туберкулезом, бруцеллезом, рожей свиней и другими инфекционными заболеваниями, возбудители обязательно содержатся в мясе. Условия убоя, использование и выборка мяса больных животных регулируются особыми ветеринарными правилами.

По степени свежести мясо подразделяют на доброкачественное, мясо сомнительной свежести и мясо, непригодное в пищу.

Доброкачественное мясо имеет сухую корочку бледно-розового или бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает.

Несвежее мясо покрыто плотной темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании пальцем ямка не заполняется. Запах неприятный, гнилостный. Такое мясо используют только по указанию ветеринарно-санитарного надзора.

Если поверхность испорченного мяса ослизненная, липкая, на разрезе оно зеленого цвета, консистенция мяса дряблая, мажущаяся, жир слизистый, с прогорклым запахом, то его бракуют, это непригодное в пищу мясо.

Для анализа берут 2 сорта мяса: свежее и несвежее. На предметных стеклах делают по два мазка-отпечатка: один - с поверхностного, другой - из глубинного слоя каждого сорта. Для приготовления препарата-отпечатка из поверхностного слоя мяса стерильными ножницами вырезают кусочек (0,5- 1 г) и прикладывают его срезанной стороной к поверхности обезжиренного, флам-бированного предметного стекла. Чтобы приготовить препараты-отпечатки из глубоких слоев, поверхность мяса прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины небольшой кусочек (0,5- 1 г), который прикладывают к стеклу. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром, окрашивают фуксином и микроскопируют, подсчитывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения и отмечая их форму.

Препарат-отпечаток свежего мяса окрашивается обычно плохо. Если он получен из поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев микроорганизмы или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Препарат-отпечаток мяса сомнительной свежести и окрашивается удовлетворительно. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается по несколько десятков микроорганизмов. Особенно много их в препарате из поверхностного слоя мяса.

Таблица 33. Оценка качества свежего мяса по микробиологическим показателям.

Количество микроорганизмов на 1см <sup>2</sup> поверхности мяса	Гигиеническая оценка мяса	Продолжительность сохранности мяса при 2 °C, сутки
< 5x10 <sup>2</sup>	Отличное	18-20
(5,0-9,9)x10 <sup>2</sup>	Хорошее	15-17
1,0x10 <sup>3</sup> -9,9x10 <sup>4</sup>	Удовлетворительное	12-14
1,0x10 <sup>4</sup> -1,0x10 <sup>5</sup>	Достаточное	9-12
> 1,0x10 <sup>5</sup>	Недостаточное	< 9

Препарат-отпечаток мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. При просмотре препаратов, как из поверхностных, так и из глубинных слоев мяса в поле зрения можно насчитать в среднем более 30 микроорганизмов.

При разложении мяса кокки в отпечатках почти отсутствуют и все поле зрения усеяно палочками. Среди гнилостных микроорганизмов преобладают микрококки, кишечная палочка, флуоресцирующие бактерии, споровые формы.

Из аэробных бактерий наиболее активно ведут гнилостный процесс *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, из факультативно-анаэробных - *Proteus vulgaris*, из анаэробных - *C. putrificus*, *C. sporogenes*.

Для выявления анаэробов поверхность мяса двух сортов (свежее и не-свежее) прижигают нагретым шпателем, стерильным ножом делают надрез и берут из глубины по небольшому кусочку. Соблюдая правила асептики, опускают их в пробирки с расплавленным и предварительно охлажденным до 50 °С МПА. Вращая пробирки между ладонями, следят, чтобы кусочки мяса осели на дно пробирок.

Кроме того, один кусочек свежего мяса опускают в пробирку со стерильной водой и в течение 5 мин вращают ее между ладонями, затем стерильной пипеткой берут из нее суспензию и наносят каплю на поверхность МПА в 1-й чашке Петри. Шпателем Дригальского вблизи горелки втирают каплю до-суха, а затем этим же шпателем проводят по поверхности среды 2-й и 3-й ча-шек Петри с МПА. Эти чашки с выросшими колониями бактерий потребуются для оценки их чувствительности к антибиотикам.

Опытные пробирки с МПА, содержащие свежее и несвежее мясо, помещают в термостат при 40°С. После инкубирования посевов в термостате в течение нескольких дней пробирки просматривают визуально.

Если мясо несвежее, на МПА развиваются газообразующие анаэробные формы и в среде обнаруживаются разрывы агара в результате выделения микроорганизмами газа.

Таблица 34. Санитарно-гигиенические показатели мяса и мясных продуктов.

Вид продукта	МАНАМ, не более КОЕ/г	Масса продукта (г), в котором не допускается наличие БГКП
Мясо свежее парное в отрубах	10	1,0
Мясо свежее охлажденное в отрубах	$1,0 \times 10^3$	0,1
Мясо замороженное в отрубах	$1,0 \times 10^4$	0,01
Полуфабрикаты натуральные	$5,0 \times 10^5$	0,001
Полуфабрикаты рубленые (фарш)	$5,0 \times 10^6$	0,0001

В пробирках со свежим мясом столбик МПА будет плотным, не содержащим разрывов и трещин, так как газообразующие анаэробные формы в нем не развиваются.

### «Санитарно-бактериологическое исследование кисломолочных продуктов»

Цель работы: освоить методы санитарно-бактериологического анализа кисломолочных продуктов.

Для анализа свежести кисломолочных продуктов предусматривается качественная оценка общего количества микроорганизмов. Для этого из хорошо гомогенизированной пробы приготавливают мазок, высушивают на воздухе, фиксируют и одновременно обезжирают смесью Никифорова (спирт:эфир в соотношении 1:1 в течение 10 минут). В этот отрезок времени смесь наливают и сливают с мазка. Этот способ фиксации освобождает мазок от молочного жира, окрашивающегося так же интенсивно, как и бактерии. Препарат высушивают, красят 3-5 минут метиленовым синим, промывают водой, высушивают и микроскопируют. При микроскопии констатируют наличие специфических и неспецифических микроорганизмов.

Специфическая (технологическая) группа микроорганизмов или закваска – это культурная раса микроорганизмов, которая используется для приготовления того или иного продукта и является обязательным звеном в технологии его получения. Наиболее важными представителями, входящими в состав заквасок для получения разнообразных кисломолочных продуктов являются следующие молочно-кислые бактерии:

*Streptococcus lactis* (молочно-кислый стрептококк) – овальные кокки диаметром 0,5-1,0 мкм, располагающиеся попарно (диплококки); мезофиллы, лучше всего развивающиеся при 30-35°C.

*Streptococcus diacetilactis* (ароматобразующий стрептококк) – подвид *S. lactis*, образующий ароматические вещества – эфиры и диацетил, что обуславливает аромат кисломолочных продуктов.

*Streptococcus cremoris* (сливочный стрептококк) – сферические клетки, образующие длинные цепочки; мезофиллы, оптимальная температура для развития 25 0C; используется для придания продукту более вязкой консистенции.

*Streptococcus thermophilus* (термофильный стрептококк) – длинные цепочки кокков с оптимальной температурой развития 40-45°C.

*Lactobacillus bulgaricus* (болгарская палочка) - крупные палочки, длиной 4-5 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток и коротких цепочек, оптимальная температура развития 40-45°C.

*Lactobacillus acidophilus* (ацидофильная палочка) – по морфологии близка к *L. bulgaricus*, но имеет температурный оптимум роста 37-40°C.

*Bifidobacterium bifidum* (бифидобактерии) – палочки, чрезвычайно вариабельные по форме, обычно несколько изогнутые, булавовидные и часто разветвленные. Расположение клеток одиночное, парами, V-образное или розетками. Являются важными представителями нормальной микрофлоры кишечника человека. Наиболее благоприятная температура для развития 37-41°C.

При выработке кефира используют не чистые культуры микроорганизмов, а естественную симбиотическую «грибковую» закваску – кефирные грибки или кефирные зерна. Они состоят из белка казеина, в котором находятся микроорганизмы в ассоциативных отношениях.

Таблица 35. Виды кисломолочных продуктов и состав заквасок, применяемых для их приготовления.

Кисломолочный продукт	Состав заквасок
Простокваша, творог	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. diacetilactis</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Сметана	<i>S. lactis</i> , <i>S. diacetilactis</i> , <i>S. cremoris</i>
Йогурт (болгарская простокваша)	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Ацидофилин	<i>S. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i>
Ряженка	<i>S. thermophilus</i>
Бифидок	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Бифилайф	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i>
Кефир	кефирный грибок

Основными пороками кисло-молочных продуктов являются излишняя кислотность, вспучивание, плесневение, которые могут быть обусловлены нарушениями в процессе изготовления и последующего хранения готовой продукции. При длительном хранении кисло-молочных продуктов в них могут развиваться неспецифические микроорганизмы,

попадающие извне (с производственного оборудования, рук, одежды, из воздуха) и вызывающие их порчу.

Излишняя кислотность является следствием изменения соотношения между основными видами заквасочных культур. Например, при увеличении количества болгарской палочки (*L. bulgaricus*) и уменьшении числа термо-фильтальных стрептококков (*S. thermophilus*) в йогурте, ряженке наблюдается об разование значительного количества молочной кислоты.

В кефире указанные изменения отмечаются при увеличении числа молочно-кислых бактерий и уменьшение дрожжей. При интенсивном развитии дрожжей в кефире могут образовываться глазки или сброженный сгусток, особенно при повышении температуры изготовления и хранения готового продукта. Причиной появления глазков в кефире могут быть и бактерии группы кишечных палочек. Вспучивание сметаны и творога чаще всего связано с развитием дрожжей, иногда – размножением кишечной палочки, попадающей в продукты при их загрязнении. Плесневение кисломолочных продуктов вызывают грибы: *Oidium lactis* (молочная плесень), образующий белую бархатистую пленку на поверхности продукта; виды рода *Penicillium* (образуют налет зеленой или серо-зеленой окраски); *Cladosporium* (развивается внутри масла в виде черных точек).

В случаях порчи продуктов при их микроскопии констатируют наличие в мазках обрывков мицелия, большого количества дрожжей или других не свойственных продукту микроорганизмов.

Если в мазке видны только специфические для данного продукта микроорганизмы, то он считается доброкачественным; если же кроме этого имеются посторонние клетки, то продукт определяется как несвежий.

### **«Санитарно-бактериологическое исследование свежих плодов и овощей»**

Санитарно-бактериологические исследования этой группы продуктов официально не регламентированы, однако необходимость подобных исследований возникает при проведении предупредительного надзора и по эпидемическим показаниям. При исследовании свежих плодов и овощей целесообразно устанавливать титр БГКП, а по расширенной схеме анализировать наличие патогенных бактерий (сальмонелл, шигелл).

Цель работы: определить степень микробной обсемененности свежих плодов и овощей.

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки на 1-2 и на 5-10 мл, салфетки марлевые 5x5 (или ватный тампон на палочке).

Среды: 9 % раствор  $\text{NaCl}$  стерильный (или вода водопроводная стерильная или 1%-ной пептонная вода); среда КОДА или среда Кесслера с лактозой (нормальной концентрации) - разлить по 10 мл в 6 обычных пробирок, в каждую пробирку поместить по поплавку или комочку ваты; среда Эндо - сразу после приготовления разлить в стерильные чашки Петри, дать застыть, за-вернуть в бумагу и оставить в холодильнике; висмут-сульфит-агар; агар Плос-кирева.

Для анализа берут смывы с поверхности 5-10 крупных плодов и овощей. Смывы производят с поверхности плодов и овощей увлажненными стерильными ватными тампонами на палочках, вмонтированных в пробирки с 5 мл стерильной воды, 9%-ного раствора  $\text{NaCl}$  или 1%-ной пептонной воды. Небольшие плоды протирают со всех сторон. После отбора проб тампон помещают в ту же пробирку и тщательно встряхивают.

Определение БГКП. Тампон, с помощью которого производили смыв с поверхности плодов и овощей, помещают в пробирку со средой КОДА или средой Кесслера с лактозой.

Культивирование проводят при 430С в течение 24 ч. Отсутствие изменений в посевах позволяют уже на этом этапе закончить исследование и дать отрицательный ответ. При изменении цвета среды КОДА с первоначально темно-зеленого на ярко-желтый сразу делают вывод о присутствии *E.coli*. При наличии роста на среде Кесслера (газообразование, помутнение, кислотообразование) дают предварительное заключение о присутствии в сыворотке БГКП с последующим контрольным высевом на чашки Петри со сре-дой Эндо для получения изолированных колоний. При инкубации при 370С через 24 ч анализируют выросшие колонии (культуральные, морфологические признаки, оксидазный тест).

Для обнаружения сальмонелл (*Salmonella*) 0,1-0,2 мл сыворотки засевают на висмут-сульфит-агар, инкубируют при 370С в течение 24 ч, после чего проверяют посевы на наличие характерных для сальмонелл при росте на этой среде черных колоний.

Для обнаружения шигелл (*Shigella*) 0,1-0,2 мл сыворотки засевают на среду Плоскирева и инкубируют при 370С в течение 24 ч, после чего посевы просматривают и при наличии прозрачных бесцветных колоний проводят их дальнейшую идентификацию.

### **«Санитарно-бактериологическое исследование мучной и крупяной продукции»**

При санитарно-бактериологическом контроле мучных и крупяных изделий, выпускаемых предприятиями общественного питания, наибольшее внимание уделяют мучнистым изделиям с различными начинками: пирожками, куле-бяками, ватрушками, пудингами, запеканками. Для этой группы продуктов определяют микробное число, титр БГКП, наличие золотистого стафилококка и протеев. По показаниям проводят анализ на наличие патогенных бактерий.

Цель работы: определить степень микробной обсемененности мучных изделий.

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки на 1-2 и на 5-10 мл, салфетки марлевые 5x5 (или ватный тампон на палочке).

Среды: 0,85 % раствор NaCl стерильный (или вода водопроводная стерильная); МПА стерильный; среда КОДА (нормальной концентрации) - разлить по 50 мл во флаконы, в каждую пробирку поместить по поплавку или ко-мочку ваты; желточно-солевой (или молочно-солевой) агар; среда Эндо - сразу после приготовления разлить в стерильные чашки Петри, дать застыть, за-вернуть в бумагу и оставить в холодильнике; висмут-сульфит агар; селенито-вый бульон.

Приготовление вытяжки. Для исследования приготавливается 10%-ная взвесь продукта, причем отдельно из мучнистой части и из начинки.

Определение титра БГКП. При определении титра БГКП производят посев 10 мл взвеси (1 г продукта) во флакон с 50 мл среды КОДА. Культивирование проводят при 430С в течение 24 ч. Отсутствие изменений в посевах позволяют уже на этом этапе закончить исследование и дать отрицательный ответ. При изменении цвета среды КОДА с первоначально темно-зеленого на ярко-желтый сразу делают вывод о присутствии *E.coli*.

Определение бактерий группы протея (*Proteus*). Бактерии группы протея выявляют по методу Шукевича. Для этого 0,1 мл жидкости вытяжки исследуемой пробы вносят в конденсационную воду (вода, которая скапливается в пробирке в нижней скошенной питательной среде) скошенного МПА. Посев штихом при этом не производят. Посевы инкубируют при 370С в течение 24 ч. При наличии протея наблюдается ползучий рост по поверхности МПА. При этом в мазках определяются мелкие неспорообразующие грам-отрицательные палочки.

Определение золотистого стафилококка (*S. aureus*). Выявление золотистого стафилококка проводят путем высева на ЖСА. Для этого из каждой отобранный пробы производят посев 0,1 мл жидкости вытяжки на чашку Петри с ЖСА. Чашки с посевами выдерживают при 370С в течение 48 ч или при 37 0С в течение 24 ч и дополнительного на свету при комнатной температуре. Затем проводят просмотр чашек, фиксируя в журнале характер роста колоний. На ЖСА золотистый стафилококк растет в виде круглых блестящих колоний золотистого цвета, вокруг которых в 60-70 % случаев образуется радужный венчик и зона помутнения среды. Если такие колонии имеются, их причисляют к виду *S. aureus*.

Мучнистая и крупяная продукция с начинкой из мяса и овощей в соответствии с действующими нормативами не должна содержать:

БГКП - в 1 г продукта;

золотистый стафилококк – в 1 г продукта;

бактерии группы протея – в 0,1 г продукта.

Микробное число не должно превышать  $2*10^4$  кл/г.

### **«Санитарно-микробиологическое исследование рук и рабочих поверхностей»**

Цель работы: определить степень микробной загрязненности и предметов обихода.

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, пипетки на 1-2 и на 5-10 мл, салфетки марлевые 5x5 (или ватный тампон на палочке).

Среды: 0,85 % раствор NaCl стерильный (или вода водопроводная стерильная); МПА стерильный; МПБ с 7,5 % NaCl стерильный; желточно-солевой (или молочно-солевой) агар; полужидкая среда с глюкозой - разлить в 3 пробирки по 7-10 мл; среда КОДА или среда Кесслера (нормальной концентрации) - разлить по 10 мл в 6 обычных пробирок, в каждую пробирку поместить по поплавку или комочку ваты; среда Эндо - сразу после приготовления разлить в стерильные чашки Петри, дать застыть, завернуть в бумагу и оставить в холодильнике; висмут-сульфит агар; селенитовый бульон.

Приготовление смывов. Для получения смывов пользуются стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками. В день взятия смыва в каждую пробирку с тампоном наливают 2 мл стерильной водопроводной воды или изотонического раствора хлорида натрия так, чтобы ватный тампон находился над уровнем жидкости. Марлевые салфетки 5x5 см заворачивают по одной в бумагу. К каждой салфетке готовят заранее пробирку с 2 мл стерильной воды для смачивания. Непосредственно перед взятием смыва пробирку наклоняют, увлажняя находящийся в ней тампон. В случае применения салфеток их захватывают кончиком стерильного пинцета, прокаленного над пламенем горелки, и увлажняют стерильной водой из пробирки.

Увлажненным тампоном или салфеткой протирают сначала кожу левой, а затем правой руки (от участков с меньшей к участкам большей загрязненности): тыл кисти, поверхность ладони, межпальцевые пространства, ногтевые ложа. По окончании процедуры салфетки или тампоны помещают в пробирку, в которой они находились.

При взятии смывов с предметов, имеющих большую поверхность, исследуемый участок ограничивают рамкой – трафаретом площадью 25, 50 или 100 см<sup>2</sup>. трафарет, изготовленный из проволоки, после каждого смыва и перед употреблением прожигают над пламенем горелки. При исследовании мелких предметов смыв делаю со всей поверхности.

Исследование смывов. Для определения общего числа микроорганизмов в исследуемом смыве к 2 мл воды, которая использовалась для увлажнения тампона, прибавляют еще 8 мл стерильной воды. Тампон тщательно в течение 2-3 мин отмывают,

получая исходное разведение. Из него готовят ряд последовательных десятикратных разведений, затем из различных разведений смыва берут по 1 мл, вносят в стерильные чашки Петри, заливают расплавленным и остуженным МПА. Посевы выдерживают 24 ч при 370С и 24 ч при комнатной температуре, после чего производят подсчет выросших колоний.

Устанавливают количество микроорганизмов в 1 мл исходного разведения смыва (число колоний в чашке умножают на степень разведения смыва).

Определяют количество микроорганизмов в 10 мл смыва, соответствующее общему числу микроорганизмов, находящихся на той площади, с которой произведен смыв (для этого величину, соответствующую количеству микроорганизмов в 1 мл смыва, умножают на 10).

Определяют количество микроорганизмов на 1 см<sup>2</sup> исследуемой поверхности (для этого величину, характеризующую количество микроорганизмов в 1 мл смыва, делят на число квадратных сантиметров, с которых сделан смыв).

Выявление бактерий группы кишечной палочки осуществляют прямым посевом исследуемого материала на чашки со средой Эндо. Материал, находящийся на тампоне, втирают в поверхность питательной среды Эндо. Кроме того, можно использовать среды обогащения (среда Кесслера, КОДА и др.) – тампон, снятый с палочки, помещают в соответствующую жидкую среду. Посевы на плотных средах инкубируют при 370С, на жидких средах – при 430С в течение 18-24 ч. На второй день из флаконов с признаками роста производят высев на чашки со средой Эндо. Дальнейший ход исследований полностью соответствует стандартной схеме БГКП.

Выявление патогенных бактерий группы кишечной палочки проводят прямым посевом исследуемого материала на чашки с висмут-сульфит агара-ром и др. Материал, находящийся на тампоне, втирают в поверхность агара. После проведенного посева тампон и оставшуюся в пробирке жидкость – смыв помещают в среду обогащения – селенитовый бульон. Через 24-48 ч инкубации при 37 0С просматривают посевы, сделанные на плотные среды, выявляя колонии, характерными для патогенных бактерий кишечной группы. Идентификация выделенных микроорганизмов с бактериями группы сальмонелл производится по методам, изложенным выше.

Выявление стафилококка производят высевом 0,5-1,0 мл смыва на молочно-солевой или желточно-солевой агар и в среду накопления (солевой бульон - МПБ, содержащий 6,5 % NaCl). Колонии с признаками, характерными для стафилококков, изучают как описано выше.

#### «Санитарно-микробиологический анализ микрофлоры ротовой полости»

Цель работы: описать микрофлору зубного налета, слизистой оболочки зева на основании данных микроскопического исследования; выделить и прородить количественный учет некоторых групп микроорганизмов из слизистой оболочки зева.

Посуда и материалы. Стерильные чашки Петри, пробирки, пипетки на 1-2 и 5-10 мл, стерильные пробирки, петли бактериологические, вата, микроскопы, стекла предметные и покровные.

Среды: 0,85 % раствор NaCl стерильный (или вода водопроводная стерильная); МПА стерильный; желточно-солевой (или молочно-солевой) агар; среда Эндо - сразу после приготовления разлить в стерильные чашки Петри, дать застыть, завернуть в бумагу и оставить в холодильнике; среда Сабуро.

Реактивы. Свежеприготовленный раствор диметил-п-фенилендиамина, свежеприготовленный 3%-й раствор KOH, реактивы для окраски по Граму, фуксин, 70%-й этанол.

**Проведение анализа.** Из зубного налета, смывов со слизистой оболочки зева готовят препараты-мазки, окрашивают их и микроскопируют. Из зубного налета также готовят препарат «раздавленная» капля для обнаружения по-движных микроорганизмов.

Для посевов берут определенный объем исследуемого материала (например, смыв из зева или зубной налет), разводят в стерильной воде (в зависимости от предполагаемой концентрации) и делают посевы из соответствующих разведений на питательные среды: для выявления стафилококка – на молочно-солевой или желточно-солевой агар; для выявления БГКП – на среду Эндо; для выявления дрожжей рода *Candida* – на среду Сабуро. Ориентировочную идентификацию микроорганизмов проводят по характеру выросших колоний, морфологии клеток, окраске по Граму.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### СРЕДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В САНИТАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

#### Среда Эндо (селективная среда для энтеробактерий)

100 мл стерильного МПА (рН 7,4) расплавляют на водяной бане и охлаждают до 700С, прибавляют 1 г лактозы (х.ч.), предварительно растворен-ной в стерильной пробирке в небольшом количестве дистиллированной воды и прокипяченной. В отдельных пробирках готовят: 2-3 мл спиртового насыщен-ного раствора фуксина и 10 мл 10 % водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. В стерильную пробирку вносят 1 мл фуксина и прибавляют раствор сульфита натрия до обесцвечивания фуксина (бледно-розовый цвет). Приготовленную смесь вли-вают в расплавленный МПА с лактозой, хорошо перемешивают и разливают по стерильным чашкам. Правильно приготовленная среда в горячем виде имеет бледно-розовый цвет, а при застывании становится бесцветной. Среду исполь-зуют немедленно, без стерилизации. Среда выпускается в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

#### Среда Кесслера (среда для выделения бактерий группы кишечной палочки)

К 1 л водопроводной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл бычьей жел-чи, кипятят смесь при перемешивании 20-30 мин на водяной бане и фильтруют через вату. Прибавляют 2,5 г лактозы (х.ч.), доводят объем водой до 1 л, уста-навливают рН 7,4-7,6, после чего добавляют 2 мл 1 % водного раствора генци-анового фиолетового для подавления роста грамположительных бактерий, разливают (по 5 и 10 мл) в пробирки с поплавками или комочками ваты и сте-рилизуют 10 мин при 1 атм.

Среда выпускается в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

#### Среда КОДА (среда для выделения бактерий группы кишечной па-лочки)

Выпускается в сухом виде. Состоит из пептона, гидролизата рыбы, хло-рида натрия, лактозы, бромтимолового синего. Среду готовят по прописи на этикетке.

#### Полужидкая среда с глюкозой

В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона; 5 г NaCl; 4-5 г агара; довдят до кипения, устанавливают рН (7,2-7,4), добавляют 1 мл 1,6 % спиртового раствора бромтимолового синего. В расплавленную среду вносят 5 г глюкозы, нагревают до кипения, разливают в пробирки столбиком высотой 3 см и стерилизуют 15 мин при 0,5 ати.

#### Среда Козера

В 1 л дистиллированной воды растворяют 1,5 г фосфата натрий-аммония [Na(NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>]; 0,2 г сульфата магния; 3 г нейтрального цитрата натрия; 1 г фосфата калия однозамещенного. Раствор разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют 30 мин при 1 ати. Среда прозрачная, при росте цитрат-ассимилирующих бактерий становится мутной.

#### Среда Клиглера

К 1 л МПА добавляют 10 г лактозы, 10 г сахарозы, 1 г глюкозы. После растворения углеводов добавляют по 10 мл 2 % раствора сульфата железа; 0,8 % раствора тиосульфата натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O) и 0,4 % раствора сульфита натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). Эта смесь служит реагентом на присутствие сероводорода. Добавляют 24 мл 1 % водно-спиртового раствора фенолового красного (рН 7,4). Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют 20-30 мин при 0,5 ати.

Среда выпускается в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

Селенитовая среда (селенитовый бульон) – среда для накопления сальмонелл

Среда состава (г): однозамещенный кислый сelenит натрия (NaHSeO<sub>3</sub>) – 4,0; пептон – 5,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 7,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3,0; лактоза – 4,0; вода дистиллированная – 1000 мл. для приготовления среды используют 2 раствора.

Раствор 1: к 950 мл раствора фосфатов добавляют пептон и лактозу. Среду разливают во флаконы и стерилизуют при 0,5 ати. При приготовлении среду подтитровывают, чтобы при добавлении пептона и селенита натрия го-товая среда имела pH 6,9-7,1. Раствор хранят при 4-100С 1-2 мес.

Раствор 2: однозамещенный кислый сelenит натрия растворяют в 40 мл стерильной дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед приготовлением среды.

В каждый флакон с 50 мл раствора 1 добавляют по 2 мл раствора 2 и перемешивают.

Среда выпускается в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

Висмут-сульфит агар (BCA) – селективная среда для сальмонелл

Среда выпускается в сухом виде. Состоит из агара, гидролизата рыбы, глюкозы, цитрата висмута, сульфита натрия, соли Мора, фосфата натрия, бриллиантового зеленого. Среду готовят по прописи на этикетке. Готовая среда имеет зеленоватую окраску.

Среды для культивирования стафиллококков

Солевой бульон (среда для накопления стафиллококков)

В 1000 мл МПБ (среда №1) растворяют 65 г NaCl; устанавливают pH 7,4 и стерилизуют при 1 ати.

Молочно-солевой агар

Непосредственно перед использованием к 100 мл расплавленного и охлажденного до 60-700С стерильного МПА (pH 7,4), содержащего 6,5 г NaCl; добавляют 10 мл стерильного обезжиренного молока (среда №5), перемешивают и разливают по стерильным чашкам Петри.

Желточно-солевой агар Чистовича

Непосредственно перед использованием к 100 мл расплавленного и охлажденного до 60-700С стерильного МПА (pH 7,2), содержащего 10,0 г NaCl; добавляют 10-20 мл желточной взвеси, перемешивают и разливают по стерильным чашкам Петри. Для приготовления желточной взвеси желток асептически извлекают из яйца, взбалтывают с 200 мл стерильного изотонического раствора NaCl (0,85 % раствор NaCl, pH 6,9-7,0).

Лактозо-солевой бульон с фенолротом

В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г мясного экстракта, 1 г дрожжевого экстракта, 5 г хлористого лития, 20 г агара. Устанавливают pH 6,8, разливают по пробиркам и стерилизуют при 121°C 15 мин. При росте коагулазоположительных стафиллококков среда желтеет (тест на коагулазу положительный).

Теллурит-полимиксии-желточный агар Крисли

В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г маннита, 20 г хлорида натрия, 2 г хлористого лития, 18 г агара. Устанавливают pH 7,3, стерилизуют 15 мин при 121°C. Перед использованием в среду добавляют 100 см<sup>3</sup> 30%-ной желточной эмульсии (на физиологическом растворе), 0,4 см<sup>3</sup> стерилизованного фильтрацией 1%-ного водного раствора полимиксина М, 10 см<sup>3</sup> стерилизованного автоклавированием (121°C 15 мин) 1%-ного водного раствора теллурита натрия.

Среда Джиолиотта и Кантони

В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 5 г мясного экстракта, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г хлористого лития, 20 г маннита, 5 г хлористого натрия, 1,2 г

глицина, 3 г пирувата натрия. Устанавливают pH 6,9, стерилизуют при 115°C 20 мин. Перед употреблением к среде добавляют 0,1 см3 1%-ного водного раствора теллурита натрия, стерилизованного фильтрацией. При росте коагулазоположительных стафилококков наблюдается почернение среды или черный осадок.

#### Среда Бэрда-Паркера

К 90 см3 основной среды с температурой 45°C добавляют 6,3 см3 глицинового раствора, 1 см3 раствора теллурита натрия, 5 см3 эмульсии желтка, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среда пригодна к использованию в течение 28 дн. (хранение при 4°C). Перед посевом на поверхность среды наносят 0,5 см3 20 %-ного водного раствора пирувата натрия, стерилизованного фильтрацией; распределяют по поверхности, подсушивают. Колонии коагулазоположительных стафилококков черные, блестящие, с узкой серо-белой полосой и окружены прозрачной зоной.

Желточная эмульсия. Свежее куриное яйцо выдерживают в 0,001 %-ном растворе HgCl2. Соблюдая требования асептики, отделяют желток и эмульгируют его в 200 см3 физиологического раствора.

Глициновый раствор. Глицин - 20 г, дистиллированная вода - 100 см3. Стерилизуют при 120°C 15 мин.

Раствор теллурита натрия. Теллурит натрия - 1 г, дистиллированная вода - 100 см3. Стерилизуют фильтрацией.

#### Среда Чаплина-Бернса

К 100 см3 МПА добавляют 3,3 см3 0,1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового и 5 г лактозы. Устанавливают pH 6,8. Стерилизуют автоклавированием (110°C 30 мин). Колонии патогенных стафилококков растут быстрее, чем непатогенных, и приобретают фиолетовый или оранжевый цвет.

#### Среда Чемпена (для выделения патогенных стафилококков)

Вариант 1 (%): пептон - 1,0; D-маннит - 1,0; натрия хлорид - 7,5; дрожжевой экстракт - 0,25; двузамещенный фосфорнокислый калий - 0,5; агар-агар - 1,5. Среду стерилизуют 90 мин при 110°C, устанавливают pH 7,0 и добавляют 10% стерильного обезжиренного молока (молоко способствует лучшему образованию пигмента).

Вариант 2 (%): пептон - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,25; желатин - 3,0; лактоза - 0,2; D-маннит - 1,0; натрия хлорид - 7,5; двузамещенный фосфорнокислый калий - 0,5; агар-агар - 1,5. Стерилизуют 90 мин при 110°C, устанавливают pH 7,0.

#### Среды для выделения стрептококков

Глюкозо-сывороточный бульон. К свежему стерильному МПБ (pH 7,4-7,6) добавляют 10% нормальной инактивированной сыворотки крови лошади и 1% глюкозы. Сыворотку и глюкозу предпочтительнее стерилизовать фильтрацией.

Глюкозо-кровяной агар. К расплавленному МПА с температурой около 45°C добавляют 1% глюкозы и 5-10% стерильной дефибринированной крови барана или кролика. Приготовленный агар разливают в чашки Петри.

Среда Эдварда (пропись фирмы Oxoid, 1982). В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 10 г сухого мясного экстракта, 1 г эскулина, 5 г натрия хлорида, 0,0013 г кристалловиолета, 0,33 г таллия сульфата и 15 г агар-агара; устанавливают pH 7,4, стерилизуют при 115°C 20 мин. К охлажденному до 45°C агару добавляют 5% стерильной дефибринированной крови овцы или крупного рогатого скота и разливают в чашки Петри. Среда обладает селективными свойствами. Используют для выделения *S. agalactiae*.

Кровяной агар с азидом натрия (пропись фирмы Oxoid, 1982). В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г триптофана, 3 г сухого мясного экстракта, 5 г натрия хлорида, 0,2 г азида натрия, 12 г агара; устанавливают pH 7,2, автоклавируют при 121°C 15 мин. К расплавленному агару с температурой 45°C добавляют 5% стерильной крови овцы, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среда предназначена для выделения патогенных стрептококков из материала, контаминированных посторонней микрофлорой. Азид натрия подавляет рост многих грамотрицательных бактерий.

Селективная среда с антибиотиками (пропись фирмы Oxoid, 1982), В расплавленную и охлажденную агаровую среду добавляют 7% дефибринированной крови барана и антибиотики (на 1000 см3 среды): налидиксовой кислоты - 7,5 мг, полимиксина В - 17000 ЕД, неомицина (или неомицина сульфата) - 2,12 мг. Каждый антибиотик предварительно растворяют в 20 см3 стерильной дистиллированной воды, Готовую среду используют в течение 48 ч при хранении в холодильнике (4-8°C). На среде ингибируется рост стафилококков, синегнойной палочки, энтеробактерий, клебсиелл и предотвращается рост протея. Если после засева на поверхность среды положить полоски фильтровальной бумаги (диски), пропитанные бацитрацином (10 ЕД), то можно дифференцировать стрептококки серогруппы А (чувствительные к бацитрацину) от (3-гемолитических стрептококков других групп, устойчивых к бацитрацину (Streatmer et al., 1962).

Молочная среда с полимиксином по Калине (для энтерококков). К 85 см3 расплавленного МПА с температурой 45 °C добавляют 1,25 см3 0,01%-ного водного раствора кристалловиолета, 0,5 см3 10%-ного водного раствора 2,3,5-ТТХ, 15 см3 стерильного обезжиренного молока, 20-40 ЕД/мл полимиксина М. Среда, разлитая в чашки Петри, пригодна для использования в течение 7—10 дн. при условии хранения в холодильнике (4°C). Типичные колонии энтерококков имеют округлую форму, ровные края, блестящую поверхность, диаметр 1,5-2 мм, красноватую окраску с зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

Желочно-кровяной агар Беленького (для энтерококков). К 600 см3 3%-ного расплавленного МПА добавляют 400 см3 нативной профиль-трованной желчи. Стерилизуют при 115°C 30 мин. К охлажденному до 45°C агару добавляют 5% дефибринированной крови и разливают по чашкам Петри. На среде растут энтерококки, но не растут гноеродные и оральные стрептококки.

Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К 1000 см3 расплавленного МПА, имеющего температуру 45-50°C, перед употреблением добавляют 0,1 г ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолийхлорид), 12,5 см3 0,01%-ного водного раствора кристалловиолета, 0,1 кислоты, 20% обезжиренного молока, 1% глюкозы, 5% стерильной дефибринированной крови. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри. ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве МПБ, Колонии *S. faecalis* вишнево-красного цвета, *S. faecium* - бесцветные или белого.

Щелочно-полимиксиновая среда Г. П. Калины (для энтерококков). Готовят отдельно три раствора.

Раствор 1: 23 см3 МПБ, 1 г глюкозы, 0,5 г натрия хлорида, 2 г дрожжевого экстракта.

Раствор 2: 25 см3 дистиллированной воды, 0,53 г Na2CO3.

Раствор 3: 25 см3 дистиллированной воды, 0,25 г двухосновного фосфата калия. Смеси стерилизуют отдельно при 112°C 12 мин.

После стерилизации все три раствора смешивают, устанавливают pH 10-10,2, добавляют воды до 100 см<sup>3</sup>, 1,6%-ного спиртового раствора бромтимоло-вого синего, 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М, Среду разливают по 5 см<sup>3</sup> в пробирки.

Среда Эндо (фуксин-сульфитный агар с полимиксином и кристаллвиолетом для энтерококков). К расплавленной среде Эндо добавляют 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М и 1,25 см<sup>3</sup> 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета на 100 см<sup>3</sup> среды. Колонии энтерококков ярко-красного цвета.

Желчно-цитратная среда (для энтерококков). К 100 см<sup>3</sup> МПА до-бавляют 20 см<sup>3</sup> дрожжевого автолизата, 100 см<sup>3</sup> желчи, 40 г цитрата натрия. Смесь кипятят на водяной бане, добавляют 0,1 г трифенилтетразолия хлори-стого и 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М. Колонии энтерококков розово-красного цвета.

Среда Вильсона-Блера (среда для культивирования мезофильных анаэробов)

Непосредственно перед использованием к 100 мл расплавленного и охлажденного до 60-700С стерильного МПА (pH 7,2), содержащего 1 % глюко-зы, добавляют 10 мл 20 % раствора сульфита натрия и 1 мл 8 % раствора хло-рида железа (FeCl<sub>2</sub>). Оба рас товра готовят на стерильной дистиллированной воде.

Питательные среды для культивирования клостридий

Среды Китта-Тароцци. Мясо или печень крупного рогатого скота нареза-ют мелкими кусочками, заливают трехкратным объемом МПБ или бульона Хоттингера (pH 7,4-7,6) и 30 мин кипятят. Затем среду фильтруют, печень (мя-со) промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. По 3-4 кусочка мяса (печени) помещают в пробирку, наливают 7-8 мл бульона, покрывают слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120°C 20 мин. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Кровяной агар с глюкозой. К 3 %-ному МПА (pH 7,2-7,4), расплавленному и охлажденному до 50°C, добавляют до 1-2 % стерильного раствора глюкозы, 15-20 % свежей дефибринированной крови барана или лошади. Разливают по чашкам Петри, подсушивают 20-30 мин в термостате. Культивирование про-водят в анаэростате.

Полужидкий агар для строгих анаэробов (Тароцци). В бульон Мартена (pH 7,2-7,4) с 0,3-0,5 % глюкозы добавляют 0,1 % агара. Среду разливают по 9 мл в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или фарша, сте-рилизуют при 120°C 30 мин. Среду можно использовать, не заливая поверх-ность вазелиновым маслом.

Агар для трубок Виньял-Вейона. В бульоне Мартена (pH 7,4) растворяют 2 % агара, 0,1 % глюкозы. Среду разливают в узкие тонкостенные пробирки и стерилизуют дробно, текучим паром в течение 3 дн.

Бульон Вейнберга для анаэробов. 1 кг бычьего сердца пропускают через мясорубку, добавляют к фаршу 1 л воды, нагревают до кипения. охлаждают, снимают жир. Смешивают 400 г печени, 400 г свиных желудков, 40 г соляной кислоты, 4 л воды, подогретой до 500С, и выдерживают при этой температуре 18-24 ч. Затем подогревают до 100°C, жидкость сливают, фильтруют, добав-ляют 0,2 % двуосновного фосфорнокислого натрия и устанавливают pH 7,4. Смешивают 1 л мясной воды из сердца быка и 2 л полученного пептона, уста-навливают pH 7,8-8,2 и стерилизуют при 120°C 30 мин. Бульон разливают по пробиркам с кусочками вареной печени, наливают стерильное вазелиновое масло слоем 0,5 см и вновь стерилизуют при 120°C 30 мин. Перед посевом к бульону добавляют стерильный раствор глюкозы до 0,5 %.

Среда Виллиса и Хоббе. Смешивают 400 см<sup>3</sup> бульона Хоттингера,

4,8 г агара, 4,8 г лактозы, 1,3 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора нейтрального красного. Стерилизуют при 115°C 15 мин, охлаждают до 50°C и добавляют 15 см<sup>3</sup> стерильной желточной суспензии (смешивают поровну куриный желток и физио-логический раствор) и 60 см<sup>3</sup> стерильного обезжиренного молока.

Железо-сульфитный агар (Вильсон, Блер, 1924). К 100 см<sup>3</sup> 3 %-ного МПА (рН 7,4) с 1% глюкозы при температуре 60°C добавляют 10 см<sup>3</sup> 20 %-ного раствора сернокислого натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) и 1 см<sup>3</sup> 8 %-ного раствора хлористого железа (FeCl<sub>3</sub>), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> предварительно стерилизуют 1 ч текучим паром. Затем среду, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. Сернистокислый натрий можно заменить серноватистокислым натрием (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), а хлористое железо-сернокислым (FeSO<sub>4</sub>). При восстановлении Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> сульфат натрия соединяется с хлорным железом и образуется черный осадок сернистого железа (FeS). Этой способностью обладают анаэробы и некоторые аэробные бактерии, вследствие чего колонии таких микроорганизмов окрашиваются в черный цвет. *C. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, изменяет цвет среды через 1-2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют зеленовато-черные колонии через 6-7 ч.

Железо-сульфитное молоко (Робинсон, Столов, 1937). К 100 см<sup>3</sup> обезжиренного молока добавляют 10 см<sup>3</sup> 20 %-ного раствора сернистокислого натрия и 1 см<sup>3</sup> 8%-ного хлористого железа. Среду готовят непосредственно перед использованием и разливают по пробиркам. На данной среде *C. perfringens* можно обнаружить в смеси со стрептококками, которые на других средах способны заметно тормозить его рост.

Бензидино-кровяной агар (Гордон, Мак Леод, 1940). К 3 %-ному МПА (рН 6,4) с 1,0 % глюкозы, подогретому до температуры 50°C, добавляют бензидин до концентрации 9,0 % и 10,0 % стерильной дефибринированной крови барана. Компоненты перемешивают до приобретения средой шоколадного оттенка, разливают по чашкам Петри и подсушивают 4-5 ч в термостате. Засеванные чашки выдерживают в анаэробных условиях в термостате 12-24 ч, а затем переносят в аэробные условия. Колонии *C. novyi* окрашиваются в черный цвет за 15-30 мин.

Раствор бензидина готовят следующим образом: к 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды добавляют 0,25 г основного бензидина, 0,3 см<sup>3</sup> 1,0 % HCl и нагревают до растворения. Раствор пригоден для употребления в течение 2 нед.

Желточно-кровяной агар (Шапина-Вегина, 1962). К 2,5 %-ному МПА добавляют 10% дефибринированной крови барана, 10% желточной взвеси. Среда предназначена для выявления *C. novyi*. Через 16 ч выращивания колонии окружены непрозрачной зоной гемолиза с наличием на поверхности среды вокруг колоний непрозрачной пленки с жемчужным блеском. Другие бактерии (аэробы, анаэробы), как правило, не дают одновременно перламутрового слоя и зоны редукции.

Полусинтетическая среда (Bonnel, Burgian, Raby, 1959). Используют для культивирования и быстрой селекции анаэробных бактерий. В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 15 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г натрия хлорида, 1,3 г агар-агара и подщелачивают Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Смесь автоклавируют при 120°C в течение 15 мин, фильтруют и добавляют 5,5 г глюкозы, 0,5 г гидросульфита натрия (предварительно растворенные в небольшом количестве воды), устанавливают рН 7,1. Добавляют 0,001 г резазурина и встраивают смесь в течение нескольких минут. Среду разливают в пробирки по 15 см<sup>3</sup>, стерилизуют при 110 °C 30 мин, охлаждают под холодной водой. При росте

анаэробов среда окрашивается в нижней части пробирки, факультативных анаэробов - весь столбик среды. Среду используют 3 нед. при хранении в условиях комнатной температуры.

Перфрингенс-агар (O.P.S.P.-агар, пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 15 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г соевого пептона, 7 г печеночного экстракта, 1 г железа аммонийно-цитратного, 1 г натрия метабисульфита, 1,5 г трис-буфера, 10 г агара, устанавливают pH 7,3. Стерилизуют автоклавированием при 1210С 15 мин, затем охлаждают до 50°C, вносят добавки (стерильно), обеспечивающие среде селективные свойства, и разливают по чашкам Петри. Добавка «А» содержит 100 см<sup>3</sup> натрия судьфадиазина, добавка «В» - 0,5 г олеандомицина фосфата и 10000 ЕД полимиксина В сульфата. Среда состоит из 100 мкг/мл натрия суль-фа-диазина, 0,5 мкг/мл олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Данный состав обеспечивает селективные свойства, оптимальные для изоляции *C. perfringens*.

Натрия метабисульфат и железо аммонийно-цитратное являются индикаторами редукции сульфита, что влияет на формирование колоний возбудителя черного цвета диаметром 2-4 мм. Рост других сульфитредуцирующих бактерий (сальмонеллы, протей, цитробактер, стафилококки, бациллы) ингибируется. На среде могут расти энтерококки, но их колонии по внешнему виду отличаются от колоний *C. perfringens*.

Анаэробный агар Шадпера (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г триптического соевого бульона, 5 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г декстрозы, 0,4 г цистеина гидрохлорида, 0,01 г гемина, 0,75 г трис-буфера, 13,5 г агара. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 мин.

С селективными добавками среду используют для выделения клоstrидий, бактероидов, флавобактерий, лактобацилл, стрептококков, (анаэробных) из проб фекалий и кишечного тракта.

Для изоляции клоstrидий и бактероидов к 1000 см<sup>3</sup> основного анаэробного агара добавляют 10 г порошка плаценты и 0,002 г неомицина. С целью выделения флавобактерий в 1000 см<sup>3</sup> вносят 7 см<sup>3</sup> 0,5 %-ного тиротрицина в этаноле. Для анаэробных лактобацилл и стрептококков в 1000 см<sup>3</sup> вносят 10 г натрия хлорида и 0,002 г неомицина. Посевы инкубируют при 37°C в анаэробных условиях.

Основной перфрингенс-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). Среда используется для изготовления TSC- или SFP-агара при предварительной идентификации и подсчете *C. perfringens*.

В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют триптоны - 15 г, соевого пептона - 5 г, мясного экстракта (сухого) - 5 г, дрожжевого экстракта - 5 г, натрия метабисульфита - 1 г, железа аммонийно-цитратного - 1 г, агара - 14 г. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при 121°C 10 мин. Затем среду охлаждают до 50°C и вносят соответствующие селективные добавки.

Трипто-сульфитный циклосериновый агар (TSC-агар). В основной перфрингенс-агар вносят D-циклосерин из расчета 400 мг/л и 50 см<sup>3</sup>/л желточной эмульсии. Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Перфрингенс-агар Шахиди-Фергусона (SFP-агар, пропись фирмы «Диф-ко», 1982). В основной перфрингенс-агар вносят следующие антибиотики: 12 мг/л канамицин-сульфат, 30000 ЕД/л полимиксин В сульфата и 50 мл/л желточной эмульсии. Готовую среду разливают в чашки Петри. На обеих указанных средах вокруг черных колоний *C. perfringens*

образуется опалесцирующая зона, указывающая на лецитиназную активность микроорганизма.

Анаэробный бульон Шадлера (пропись фирмы «Дифко», 1982). По составу среда аналогична анаэробному агару Шадлера, но из нее исключен агар. Используют для выращивания патогенных анаэробов, для определения антибиотикоустойчивости анаэробов методом разведений с выражением результата в виде МИК.

Тиогликоловый бульон (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 0,5 г L-цистина, 2,5 г натрия хлорида, 5,5 г декстрозы, 5 г дрожжевого экстракта, 15 г панкреатического перевара казеина, 0,5 г натрия тиогликолята. Устанавливают pH 7,1, разливают по емкостям и стерилизуют при 121°C 15 мин. Перед использованием среду кипятят и охлаждают.

Рекомендуется для контроля на контаминацию различных материалов анаэробными бактериями.

Анаэробный агар Уилкинс-Чангрена (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г триптофана, 10 г желатиново-го пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г декстрозы, 5 г натрия хлорида, 1 г L-аргинина, 1 г натрия пирувата, 0,0005 г менадиона, 0,005 г гемина, 10 г агара. Устанавливают pH 7,1, стерилизуют при 121°C 15 мин.

Среда рекомендуется для изоляции анаэробных микроорганизмов из клинических материалов, является стандартной для определения антибиотикочувствительности анаэробных бактерий. При исключении агара среда может быть использована как питательный бульон.

Обогащенный клоstrидиальный агар (RCM-агар, пропись фирмы «Диф-ко», 1982). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 3 г дрожжевого экстракта, 10 г мясного экстракта, 10 г пептона, 5 г декстрозы, 1 г растворимого крахмала, 5 г натрия хлорида, 3 г натрия ацетата, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 15 г агара. Устанавливают pH 6,8, стерилизуют при 121°C 15 мин.

Среда рекомендуется для исследования кишечной микрофлоры. Pergu et al. (1955) использовали ее для изучения рубцовых стрептококков, Bornes, Goldberg (1962), внеся в состав хлортетрациклина гидрохлорид или натрия азид, применяли среду для исследования фекес кур. С добавками крови она пригодна для обнаружения в фекес животных и людей лактобацилл, с добавками крови и неомицина - бактериоидов.

#### Среды для выделения энтерококков

Молочная среда с полимиксином по Калине (для энтерококков). К 85 см<sup>3</sup> расплавленного МПА с температурой 45°C добавляют 1,25 см<sup>3</sup> 0,01 %-ного водного раствора кристаллвиолета, 0,5 см<sup>3</sup> 10 %-ного водного раствора 2,3,5-ТТХ, 15 см<sup>3</sup> стерильного обезжиренного молока, 20-40 ЕД/мл полимиксина М. Среда, разлитая в чашки Петри, пригодна для использования в течение 7-10 дн. при условии хранения в холодильнике (4°C). Типичные колонии энтерококков имеют круглую форму, ровные края, блестящую поверхность, диаметр 1,5-2 мм, красноватую окраску с зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

Желчно-кровяной агар Беленького (для энтерококков). К 600 см<sup>3</sup> 3,0 %-ного расплавленного МПА добавляют 400 см<sup>3</sup> нативной профильтрованной желчи. Стерилизуют при 115°C 30 мин. К охлажденному до 45°C агару добавляют 5,0 % дефибринированной крови и разливают по чашкам Петри. На среде растут энтерококки, но не растут гноеродные и оральные стрептококки.

Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К 1000 см<sup>3</sup> расплавленного МПА, имеющего температуру 45-50°C, перед употреблением добавляют 0,1 г ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолийхлорид), 12,5 см<sup>3</sup> 0,01 %-ного водного раствора кристаллвиолета, 0,1 кислоты, 20,0 % обезжиренного молока, 1,0 % глюкозы, 5,0 % стерильной дефибринированной крови. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри. ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве МПБ. Колонии *S. faecalis* вишнево-красного цвета, *S. faecium* - бесцветные или белого.

Щелочно-полимиксиновая среда Г. П. Калины (для энтерококков). Готовят отдельно три раствора.

Раствор 1: 23 см<sup>3</sup> МПБ, 1 г глюкозы, 0,5 г натрия хлорида, 2 г дрожжевого экстракта.

Раствор 2: 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 0,53 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Раствор 3: 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 0,25 г двухосновного фосфата калия. Смеси стерилизуют раздельно при 112°C 12 мин.

После стерилизации все три раствора смешивают, устанавливают pH 10-10,2, добавляют воды до 100 см<sup>3</sup>, 1,6 %-ного спиртового раствора бромтимо-лового синего, 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М. Среду разливают по 5 см<sup>3</sup> в про-бирки.

Среда Эндо (фуксин-сульфитный агар с полимиксином и кристаллвиолетом для энтерококков). К расплавленной среде Эндо добавляют 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М и 1,25 см<sup>3</sup> 0,01 %-ного водного раствора кристаллвиолета на 100 см<sup>3</sup> среды. Колонии энтерококков ярко-красного цвета.

Желчно-цитратная среда (для энтерококков). К 100 см<sup>3</sup> МПА добавляют 20 см<sup>3</sup> дрожжевого автолизата, 100 см<sup>3</sup> желчи, 40 г цитрата натрия. Смесь ки-пятят на водяной бане, добавляют 0,1 г трифенилтетразолия хлористого и 200 ЕД/см<sup>3</sup> полимиксина М. Колонии энтерококков розово-красного цвета.

Питательные среды для культивирования бактерий рода *Bacillus*

Среда ГКИ (Шляхов, 1973). К раствору Хенкса добавляют 40 % (объем/объем) стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной при 56°C 30 мин. Раствор Хенкса можно заменить бульоном Хоттинге-ра (pH 7,2-7,4). Среду используют для обнаружения способности капсулоб-разования у *B. anthracis*.

Среда Томова (Шляхов, 1973). В состав среды входят 50 см<sup>3</sup> пептонного агара (10%-ный раствор агара, 2,5 %-ный раствор пептона, 0,5 %-ный раствор натрия хлорида), 100 см<sup>3</sup> сыворотки крови крупного рогатого скота, 50 см<sup>3</sup> ку-риного белка, 25 см<sup>3</sup> 0,4 % гемина в 0,01 н. растворе натрия гидроксида, 25 см<sup>3</sup> 0,01 н. уксусной кислоты. В стерильной колбе смешивают сыворотку крови, белок, подогревают до 50°C и добавляют к расплавленному пептонному агару, имеющему температуру 50°C. Затем добавляют раствор гемина, уксусную кислоту, компоненты перемешивают и стерильно разливают в чашки Петри. На данной среде возбудитель сибирской язвы растет в S-или SM-форме, Среда обладает селективными свойствами: растут *B. anthracis*, *B. cereus*, не растут *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. mycoides*.

Среда Knisely (1966). К расплавленному питательному агару добавляют 40 мг/мл лизоцима, 30 ЕД/мл полимиксина, 300 мг/мл натри-евой соли этилендиа-минотетрауксусной кислоты (ЭДТА), 40 мг/мл таллия ацетата. Растворы предварительно стерилизуют фильтрацией. Устанавливают pH 7,35. Через 24-48 ч инкубирования при 37°C *B. anthracis* вырастает в виде мелких, гладких колоний. Другие виды бацилл на этой среде обычно не растут.

Лизоцимовая среда (Claus, Berkeley, 1986), Первоначально готовят рас-твор лизоцима, содержащий 10000 ЕД/мл в дистиллированной воде, и стерили-зуют фильтрацией. 1 мл раствора лизоцима смешивают с 99 мл стерильного питательного бульона и разливают по 2,5 мл в пробирки. При изучении ба-цилл, патогенных для насекомых, 1 мл лизоцимового раствора (0,1%) смешивают с 99 мл полужидкого агара, который готовят следующим образом, В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г агара, 3 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, по 5 г дрожжево-го экстракта и триптона; фильтруют, устанавливают pH 7,3-7,5 и стерилизуют при 121°C 20 мин. Затем стерильно добавляют раствор глюкозы из расчета 2 г/л. Глюкозу предварительно стерилизуют в виде 10%-ного раствора при 115°C 20 мин. Используют для идентификации видов рода *Bacillus*.

Дифференциаль-но-диагностическая среда. К 100 мл питательного агара, расплавленного и имеющего температуру 45-50°C, добавляют следующие растворы: 0,5 см<sup>3</sup> полимиксина М сульфата, 0,5 см<sup>3</sup> невиграмона, 1,0 см<sup>3</sup> гри-зоофульвина, 10 см<sup>3</sup> моющего средства «Про-гресс», 0,1 см<sup>3</sup> натрия фенолфта-леинфосфата. Компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри. Среда пригодна 1-2 сут при хранении в условиях холодильника. Через 18-24 ч куль-тивирования посевов в крышку чашки Петри вносят 1-2 см<sup>3</sup> 25 %-ного водного раствора аммиака. Чашку выдерживают (крышкой вниз) при 20°C 1 мин и учитывают результат. Колонии бактерий с фосфатазной активностью розовеют, остальные колонии, в том числе *B. anthracis*, остаются бесцветными. Среда обладает селективными свойствами.

Приготовление растворов. Полимиксина М сульфат растворяют в физиоло-гическом растворе с расчетом 10000 ЕД/см<sup>3</sup>. Невиграмон растворяют в 25 %-ном водном растворе аммиака, затем разводят стерильным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида до концентрации 100 мкг/см<sup>3</sup>. Моющее средство «Про-гресс» разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации 0,1 %. Гризофульвин растирают в ступке, растворяют в стерильной дистиллирован-ной воде до концентрации 100 мкг/см<sup>3</sup>. Натрия фенолфталеинфосфат (коммер-ческий 10 %-ный раствор) прогревают на водяной бане при 56°C 30 мин. Среду используют для выделения из загрязненного материала возбудителя сибирской язвы.

Среда Буза (Шляхов, 1973), К 3 %-ному голодному (без пептона) агару (pH 7,2-7,4) добавляют 15% дефибринированной крови барана. Используют для культивирования возбудителя сибирской язвы.

Селективный агар для выделения и идентификации *B. cereus* (Hoibrook, Anderson, 1980). В 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 1 г пептона, 10 г маннита, 2 г натрия хлорида, 0,1 г магния сульфата, 2,5 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,25 г KН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,12 г бромтимолового синего, 10 г натрия пирувата, 14 г агара. Стерилизуют автоклавированием при 121°C 15 мин. К расплавленному и охла-жденному до 50°C агару добавляют стерилизованный фильтрацией раствор полимиксина В на дистиллированной воде из расчета конечного содержания 100 ЕД в 1 мл среды. Компоненты перемешивают и среду разливают в чашки Петри. Типичные колонии *B. cereus* диаметром около 5 мм с характер-ным си-неватым оттенком (расщепление маннита) и окружены зоной преципитации желточной эмульсии аналогичного цвета. По этим признакам *B. cereus* можно отличить от других бацилл, кроме *B. thuringiensis*. Изменение желточного ком-понента в среде вызывают также *S. aureus*, *S. marcescens*, *P. vulgans*, но имеют другую форму колоний и зону просветления вокруг них.

Жидкая среда обогащения для выделения *B. cereus* (Claus, 1955). В 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г KNO<sub>3</sub>, 5 г пептона, 3 г мясного экстракта. Устанавливают pH 7,0, стерилизуют при 120°C 15 мин. Исследуе-мый материал

предварительно прогревают при 80 °C 10 мин. Через 24 ч инку-бирования при 30°C одну бактериологическую петлю засевают на питатель-ный агар с желточной эмульсией. Культивируют при 37°C для подавления ро-ста *B. mycoides*.

## **Контрольные вопросы**

1. Что изучает санитарная микробиология?
2. Назовите основные задачи санитарной микробиологии.
3. Назовите основные направления общей санитарной микробиологии.
4. Назовите основные санитарно-показательные микроорганизмы и предъявляемые к ним требования.
5. Какова роль микроорганизмов в круговороте веществ?
6. Укажите основные характеристики микроорганизмов, относящихся к нормальной микрофлоре человека.
7. Какие бактерии, входящие в состав нормальной микрофлоры, способны вызвать заболевания?
8. Какие методы считаются основными при выявлении патогенных микроорганизмов?
9. Назовите основные направления частной санитарной микробиологии и их особенности.
10. Что такое бактериофаги? Основные свойства бактериофагов.
11. Что такое патогенность микроорганизмов?
12. Что такое вирулентность микроорганизмов?
13. Что такое иммунная система?
14. Характеристика отдельных представителей патогенных микроорганизмов.
15. Основные санитарно-гигиенические показатели качества воды и методы санитарно-бактериологического исследования воды.
16. Назовите основные пути и источники бактериального загрязнения водоемов.
17. Методы определения и количественного учета показателей фекального загрязнения воды.
18. Какова нормальная микрофлора почвы?
19. Какие факторы влияют на качественный и количественный состав почвы?
20. Назовите представителей микрофлоры, применяемых для оценки санитарного состояния почв и особенности их выявления и выделения.
21. Какие показатели характеризуют фекальное загрязнение почвы?
22. Какие исследования проводят при полном санитарно-микробиологическом анализе почвы?
23. Какова цель определения в почве нитрифицирующих бактерий?
24. От чего зависит микрофлора воздуха?
25. Назовите методы отбора проб воздуха.
26. Особенности санитарно-гигиенической оценки качества воздуха.
27. Назовите особенности предметов обихода как объектов санитарно-бактериологического анализа.
28. Назовите особенности пищевых продуктов как объектов санитарно-бактериологического исследования.
29. Какая микрофлора пищевых продуктов относится к специфической и неспецифической?
30. Принципы санитарно-бактериологического нормирования пищевых продуктов.
31. Назовите методы, применяемые при санитарно-бактериологическом исследовании пищевых продуктов.

32. Особенности санитарно-бактериологического исследования консервированных продуктов.

33. Особенности санитарно-бактериологического исследования молока и молочно-кислых продуктов.

34. Чем определяется выбор способа осуществления противомикробных мероприятий?

## **Словарь терминов**

**АВТОКЛАВ** - аппарат для стерилизации паром под давлением.

**АГАР** - вещество полисахаридной природы, получаемое из морских водорослей; добавляют в питательные среды для их уплотнения.

**АГГЛЮТИНАЦИЯ** - реакция иммунитета, при которой бактерии, клетки или другие частицы слипаются и выпадают в осадок.

**АНАТОКСИН** - токсин микроорганизмов, утративший токсичность в результате какого-либо воздействия, но сохранивший свою антигенность.

**АНТИГЕН (АГ)** - чужеродное вещество, попадающее в организм; вызывает развитие специфических иммунологических реакций, выработку антител.

**АНТИСЕПТИК** - химическое вещество, которое служит для обработки биологических поверхностей.

**АНТИТЕЛО (АТ)** - вещество, которое относится к иммуноглобулинам и специфически взаимодействует с антигеном.

**АНТИТОКСИН** - антитела, которые образуются в ответ на антигенные токсические вещества биологического происхождения.

**АУТОТРОФ** - микроорганизм, который использует в качестве источника углерода неорганические соединения.

**АЭРОБ** - микроорганизм, который живет и размножается в присутствии свободного кислорода.

**БАКТЕРИЕМИЯ** - циркуляция живых бактерий в кровотоке, несопровождающаяся их размножением.

**БАКТЕРИОФАГ** - вирус, поражающий бактерии.

**БАЦИЛЛОНОСИТЕЛЬСТВО** - бессимптомные инфекции.

**БОТУЛИЗМ** - острая инфекция, вызванная палочкой *Clostridium botulinum* и ее токсином, содержащимся в анаэробных условиях.

**БРУЦЕЛЛЕЗ** - заболевание, передающееся человеку от больного животного при прямом контакте или через плохо проваренное мясо. Болезнь характеризуется повышенным потоотделением, лихорадкой. Вызывается микроорганизмами рода *Brucella*.

**БРЮШНОЙ ТИФ** - кишечная инфекция; вызывается возбудителем *Salmonella typhi*. Характерны лихорадка, высыпание розовых пятен на груди и животе, диарея.

**ВАКЦИНА** - препарат, созданный на основе живых или убитых микроорганизмов; используется для предупреждения инфекционных заболеваний.

**ВИРУЛЕНТНОСТЬ** - степень болезнетворности микроорганизмов.

**ВИРУС** - мельчайшие организмы, не способные жить и размножаться вне живых клеток. Вызывает заболевания у растений, животных и человека.

**ГАЛОФИЛЫ** - микроорганизмы, которые растут при повышенной концентрации соли в питательной среде.

**ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЯ** - агглютинация эритроцитов.

**ДЕЗИНФЕКТАНТ** - химическое вещество, уничтожающее или приостанавливающее активность болезнетворных микроорганизмов. Используется для обработки помещений, инструментов и т. д.

**ДЕЗИНФЕКЦИЯ** - уничтожение патогенных микроорганизмов в окружающей среде.

**ДЕТЕРГЕНТ** - поверхностно-активное вещество; чистящий или моющий агент.

**ДИСБАКТЕРИОЗ** - количественное или качественное нарушение микрофлоры кишечника.

**ДИФТЕРИЯ** - инфекционное заболевание, возбудитель *Corynebacterium diphtheriae*.

**ЗООНОЗ** - инфекция, передающаяся человеку от больных животных.

**ИММУНОГЛОБУЛИНЫ** - белки, связанные с глобулиновой фракцией сыво-ротки крови. Их разделяют на несколько фракций: IgA, IgD, IgL, IgM, IgE.

**ИММУНОДЕФИЦИТ** - состояние, развивающееся при нарушении защитных механизмов организма.

**ИНВАЗИВНОСТЬ** - свойство патогенных бактерий проникать в органы и ткани хозяина.

**ИНДЕКС САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ** - содержание искомого микроорганизма в 100 мл (если исследуется вода), в 1 мл и 1 г (если исследуются другие жидкие или плотные субстраты).

**ИНТЕРФЕРОН** - гликопротеин, вырабатываемый различными клетками организма; обладает широким антивирусным спектром действия.

**ИНФЕКЦИЯ** - совокупность явлений, происходящих в макроорганизме при попадании в него патогенных микроорганизмов.

**КАПСИД** - белковая оболочка вируса.

**КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ** - не обесцвечиваются при обработке кислым спиртовым раствором после окрашивания.

**КОЛИ-ФАГ** - бактериофаг, поражающий штаммы *E. coli*.

**КОММЕНСАЛИЗМ** - вид симбиотических отношений между макроорганизмами и микроорганизмами. К бактериям-комменсалам могут относиться условно-патогенные микроорганизмы.

**КОНЬЮГАЦИЯ** - соединение женской и мужской гамет многоклеточных организмов.

**ЛИЗОГЕНИЯ** - способность различных штаммов бактерий, содержащих бактериофаги, лизировать другие штаммы бактерий.

**ЛИЗОЦИМ** - фермент, который разрушает клеточные стенки некоторых бактерий.

**МИКОБАКТЕРИИ** - аэробные, грам+, кислото-спирто-устойчивые палочко-видные бактерии. Являются возбудителями туберкулеза, лепры.

**МИКРОАЭРОФИЛ** - аэробный микроб, который нуждается в меньшей концентрации кислорода, чем его содержание в воздухе.

**МИКРОБНОЕ ЧИСЛО** - количественный показатель бактериальной зараженности окружающей среды; представляет собой количество выросших на МПА колоний, приходящихся на 1 мл жидкости, 1 г твердого вещества или 1 см<sup>2</sup> поверхности исследуемого объекта.

**МИКРОСКОПИЯ** - один из методов исследования и идентификации микроорганизмов, который осуществляется с помощью микроскопов, при обязательном окрашивании бактерий.

**МУТУАЛИЗМ** - взаимовыгодное сожительство макро- и микроорганизма.

**НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА** - полимер, состоящий из нуклеотидов. В зависимости от типа сахара нуклеиновая кислота называется ДНК или РНК.

**НУКЛЕОКАПСИД** - комплекс капсида и генома вируса.

**ОБЩАЯ МИКРОБНАЯ ОБСЕМЕНЕННОСТЬ (ОМО)** - количество микроорганизмов в 1 мл воды, жидкости или в 1 г твердого вещества. Определение ОМО позволяет говорить о возможном заражении изучаемого объекта патогенными микроорганизмами.

**ОКРАСКА** - метод окрашивания микроорганизмов. Существуют простые и сложные способы окрашивания. К сложным способам относится окраска по Граму.

**ПАРАЗИТ** - организм, который живет и размножается в другом организме (хозяине).

**ПАРАЗИТИЗМ** - вид взаимоотношений, при которых паразит живет за счет хозяина и наносит ему вред.

**ПАТОГЕННОСТЬ** - способность микроорганизмов вызывать заболевание.

**ПЕНИЦИЛЛИНЫ** - антибиотики, продуцируемые грибами рода *Penicillium*. Обладают бактерицидным действием по отношению к грамположительным микроорганизмам.

**ПЕРИОД ИНКУБАЦИОННЫЙ** - время, прошедшее с момента попадания микроорганизма в макроорганизм до появления первых клинических признаков заболевания.

**ПЕСТРЫЙ РЯД** - набор дифференциально-диагностических сред, который используется для определения биохимической активности бактерий. Обычный набор включает среды с глюкозой, лактозой, маннитом, сахарозой и мальто-зой.

**ПИЛИ** - ворсинки, располагающиеся на поверхности бактериальной клетки; служат для прикрепления к органам и тканям хозяина.

**ПИОЦИАНИН** - пигмент, выделяемый синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*); окрашивает агаровую среду в сине-зеленый цвет.

**ПЛАЗМИДА** - клеточный элемент, не связанный с генетическим аппаратом клетки-хозяина, но способный передавать генетическую информацию. Например, плазми-ды резистентности несут гены, ответственные за устойчивость микробов к тем или иным антибиотикам.

**ПНЕВМОНИЯ** - воспаление доли или всего легкого, обычно инфекционное. Может вызываться различными микроорганизмами.

**ПРОКАРИОТ** - низший микроорганизм, не имеющий ядра. Имеет двойную нить ДНК, сомкнутую в кольцо и свободно плавающую в цитоплазме. Это ядерное вещество или нуклеоид клетки. К прокариотам относятся бактерии и сине-зеленые водоросли.

**ПРОТЕИНАЗЫ** - ферменты, расщепляющие связи белков.

**РЕЗЕРВУАР ИНФЕКЦИИ** - организм, в котором циркулирует возбудитель и может не вызывать заболевание у хозяина, что характерно для природно-очаговых инфекций.

**РЕИНФЕКЦИЯ** - повторное заражение одним и тем же возбудителем.

**РЕКОМБИНАНТ** - микробная клетка, получившая участки ионов родительских особей, относящихся к разным штаммам.

**РЕЦИДИВ** - инфекционный процесс, который формируется под действием циркулирующего в организме возбудителя, а не в результате нового заражения.

**САЛЬМОНЕЛЛЕЗ** - гастроэнтерит, вызываемый микроорганизмами рода *Salmonella*.

**САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ** - микроорганизмы (грибы, бактерии, вирусы), являющиеся показателями загрязнения окружающей среды, которые выделяются из организма человека или животных.

**СИМБИОЗ** - взаимовыгодное сожительство двух организмов.

**СПОРА** - уплотненный участок цитоплазмы с материнской ДНК. Служит бактериальным клеткам для перенесения неблагоприятных условий окружающей среды. Как правило, спора образуется у палочковидных форм.

**СТАФИЛОКОККОЗ** - инфекция, вызванная различными видами бактерий рода *Staphylococcus*.

**СТЕРИЛИЗАЦИЯ** - полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор.

**ТЕТРАЦИКЛИНЫ** - антибиотики широкого спектра действия, продуцируемые некоторыми видами *Streptomycetes*. Активны в отношении грам+ и грам- микро-организмов, а также риккетсий, хламидий, микоплазм.

**ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА** - способность микроорганизмов окрашиваться различными красителями.

**ТИТР САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ** - наименьшее количество исследуемого объекта (мл и г), в котором присутствует искомый микроорганизм.

**ТОКСИГЕННОСТЬ** - способность микроорганизмов вырабатывать яды, отравляющие макроорганизм.

**ТОКСИН** - ядовитое вещество белковой природы, вырабатываемое бактериальными клетками.

**ФАГОЦИТОЗ НЕЗАВЕРШЕННЫЙ** - микроорганизмы сохраняют свою жизнеспособность в клетках-фагоцитах. Это связано с особенностями строения бактерий и способностью их образовывать капсулу.

**ФУКСИН** - красный краситель; используется для окраски мазков и препаратов в бактериологии и гистологии.

**ХЕМОТАКСИС** - движение клеток фагоцитов по направлению к объекту (положительный хемотаксис).

**ХЛОРАМИН** - химическое вещество, использующееся в практической медицине в качестве дезинфицирующего агента.

**ХОЗЯИН** - организм, в котором живет и размножается паразит. Хозяин может быть промежуточным и окончательным.

**ЦЕНОЗ** - сообщество микроорганизмов, обитающих в определенных условиях.

**ЦЕФАЛОСПОРИНЫ** - антибиотики природного происхождения, вырабатываемые грибами *Cephalosporium acremonium*.

**ЦИКЛОСЕРИН** - антибиотик, вырабатываемый разными видами *Streptomycetes*.

**ШТАММ** - микроорганизмы одного вида, выделенные одномоментно из одного источника.

**ЭКЗОТОКСИН** - токсин, вырабатываемый некоторыми грамположительными микроорганизмами; обладает специфическим действием на организм, т. е. поражает определенные органы и ткани.

**ЭКЗОФЕРМЕНТ** - выделяется клеткой во внешнюю среду, что приводит к повреждению тканей организма, так же может расщеплять макромолекулы до более простых соединений.

**ЭНДОТОКСИН** - токсин; тесно связан с телом микробной клетки и освобождается только при ее разрушении. Не отличается специфическим действием на организм.



## **Список использованных литературных источников**

1. Байчурина А.З. и др. В кн.: Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 1998.
2. Биоиндикация. Микробиологические показатели: Лабораторные занятия для студентов-экологов (бакалавров): Методические указания / Н.В. Верховцева, Г.В. Кондакова; Ярославс. гос. ун-т им. П.Г. Демидова. – Ярославль, 1998. – 32 с.
3. Борисов Л.Б. медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: Медицина, 1994.
4. Вольпе И.М., Кучеренко В.Д. Практическое руководство по санитарной микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1970.
5. Клевакин В.М., Карцев В.В. Санитарная микробиология пищевых продуктов. – М.: Медицина, 1986. – 176 с.
6. Кочемасова З.Н., Ефремова С.А., Рыбакова А.Н. Санитарная микро-биология и вирусология. – М.: Медицина, 1987. – 352 с.
7. Кондакова Г.В. Санитарная микробиология: Текст лекций / Г.В. Кондакова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – 84 с.
8. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб.: Специальная литература, 1998.
9. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978.
10. Методы частной бактериологии. Учебно-методичекой пособие / Васильев и др., 1999.
11. Мишустин Е.Н., Перцовская М.И., Горбов В.А. Санитарная микробиология почвы. – М. наука, 1979. -304 с.
12. Мудрецова-Висс К.А.. Микробиология. – М.: Экономика, 1978. – 240 с.
13. Мудрецова-Висс К.А., Колесник С.А., Гринюк Т.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Экономика, 1975. – 167 с.
14. Пивоваров Ю.П., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и идентификация). – М.: Издательство ИКАР, 2000. – 268 с..
15. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 2001.
16. Санитарная микробиология / Под ред. Г.П. Калины, Г.Н. Чистовича. – М. Медицина, 1969. – 384 с.
17. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т.2. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрейвса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. – 496 с.
18. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследований / Под ред. М.О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
19. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева; Под ред. В.К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп.- М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

## **Нормативно-техническая документация**

20. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ.

21. ПНД Ф СБ 14.1.77-96. Методы санитарно-биологического контроля. Методическое руководство по гидробиологическому и бактериологическому контролю процесса биологической очистки на сооружениях с аэротенками. М., 1996. – 61 с.
22. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения. СанПиН 2.1.7.573-96. М., 1997
23. МУ 2.1.7.730-99 Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест.
24. СП 1.2.731-99 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.
25. МУК 4.2.734-99 Микробиологический мониторинг производственной среды.
26. МУК 4.2.801-99 Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции.
27. МУК 4.2.999-00 Определение количества бифидобактерий в кисломо-ложных продуктах.
28. ГН 2.3.2.1010-01 Микробиологический показатель: *Listeria Monocitogenes* в пищевых неконсервированных продуктах, в том числе для детского питания.
29. СанПиН 2.1.7.573-96 Гигиенические требования к использованию сточных вод для орошения и удобрения. М.: Минздрав России, 1997. – 54 с.
30. СанПиН 2.1.5.980-00 Гигиенические требования к охране поверхностных вод.
31. МУК 4.2.1018-01 Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды (взамен МУК 4.2.671-97).
32. СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества (взамен СанПиН 2.1.4.559-96).
19. СанПиН 2.1.2.568-96 «Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды плавательных бассейнов».
20. СанПиН 2.3.2.1078-01 (с поправками 2002, 2003) Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (взамен СанПиН 2.3.2.560-96).
21. СанПиН 2.1.7.1287-03 Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы и грунтов.
22. Руководство Р 3.1.683-98 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздушной среды помещений организаций пищевой промышленности, общественного питания и торговли продовольственными товарами».
23. МУ 2.3.975-03 «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию».
24. СанПиН 2.1.2.1199-03 «Парикмахерские. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию».
25. ГН 2.1.6.1041-01 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест».
26. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов / Утв. МЗ СССР, Москва, 1990. – 27 с.
27. Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации. М., МЗ России, 2005.
28. Молоко и молочные продукты. Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесени. Метод подсчета колоний при 25 °C / ISO 6611:2004.

29. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens* / ГОСТ 10444.9-88.
30. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella* / ГОСТ 30519-97.
31. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа / ГОСТ 9225-84.
32. Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков / ГОСТ 28566-90.
33. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий / ГОСТ 29185-91.
34. Мясо и продукты мясные. Подсчет *Pseudomonas* spp. / ISO 13720:1995.
35. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli* / ГОСТ 30726-2001.
36. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов / ГОСТ 10444.15-94.
37. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству воды. СанПиН 2.1.7.1287-03, М., МЗ РФ, 2003.

АГТУ

Заказ

тираж 40 экз.