Департамент образования администрации г. Арзамаса

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение

"Средняя школа №2 им. А.С. Пушкина"

Секция «Микробиология, вирусология»

**«Методика неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ)»**

Автор работы:

ученик 11 класса «Б»

Калошкин Дмитрий, 17 лет

Руководитель:

Канарейкина Марина Александровна,

учитель химии и биологии

телефон: 8 (83147)7-40-78

8(902)782-16-52

e-mail: mar584502@yandex.ru

Нижегородская область

г. Арзамас

2021 год

**Оглавление**

Введение 4

Глава I. Обзор литературы 8

1. Лабораторные методы диагностики вирулентности культур микроорганизмов 8

2. Теоретическая модель методики неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ). Достоинства и недостатки методики 9

Глава II. Практическое решение методики. Анализ полученных результатов 12

1. Понятие нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ). Определение референсных значений ННРЛ. Специфика употребления показателя 12

2. Проведение тестовых испытаний определенно вирулентной культуры (ОВК) методом НИВМ 12

3. Проведение тестовых испытаний определенно авирулентной культуры (ОАВК) методом НИВМ 13

4. Анализ эффективности метода НИВМ 14

Заключение 15

Информационные источники 16

Приложение 17

**Список сокращений и специальных терминов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ГКС** | – | гемо-культуральная смесь |
| **ДККД** | – | декоагулированная кровь донора |
| **КВ** | – | коэффициент вирулентности |
| **МСФК** | – | метиленовый синий-карболовый фуксин |
| **НИВМ** | – | неинвазивная идентификация вирулентности микроорганизма |
| **ННРЛ** | – | нормальная некротическая реакция лейкоцитов |
| **ОАВК** | – | определенно авирулентная культура |
| **ОВК** | – | определенно вирулентная культура |
| **ЧЛЛ100** | – | число лизированных лейкоцитов на 100 подсчитанных клеток |
| **ЧКМ1** | – | число колоний микроорганизмов на 1 лейкоцит |
| **BUAV** | – | British Union for the Abolition of Vivisection.  Британский союз за отмену вивисекции |
| **PETA** | – | People for the Ethical Treatment of Animals.  Люди за этичное отношение к животным |

## Введение

С глубокой древности в процессе своей жизнедеятельности люди были неразрывно связаны с миром микроорганизмов. Прокариотические (бактерии, вирусы) и некоторые эукариотические организмы (протисты, простейшие животные и некоторые грибы), составляющие несистематическую группу «микробы», окружали их повсюду. С течением времени люди стали использовать некоторых из них в собственных целях. Приготовление кисломолочных продуктов, синтез алкоголя, консервация некоторых продуктов питания таких, как например, рыба и овощи – все это стало серьезным шагом человечества на пути коммуникации с микроорганизмами и заложило основы изучения различных, но, безусловно, достаточно примитивных культуральных показателей живых объектов. В то же время многие микроорганизмы наносили серьезный урон человечеству, инициируя развитие различных заболеваний (в основном инфекционной этиологии), очень часто приводящих к летальным случаям.

Появление явления ле́карства (простейшей квазиврачебной помощи), а позднее примитивных иммуногенных мероприятий позволило человечеству научиться предупреждать развитие инфекционных процессов, а также контролировать их распространение. Изобретение специального оборудования для изучения микромира – первейших микроскопов и увеличительных стекол, а впоследствии и бурный рост микробиологических дисциплин (бактериологии, микологии и протистологии) позволил заняться полноценным изучением микроорганизмов. Исследователи смогли определять не только простейшие культуральные свойства микробов (например, способность синтезировать уксус - спиртовое брожение уксуснокислых бактерий, или сбраживать вино - анаэробный гликолиз дрожжей), но и теперь им открылась возможность создания таксономической системы, изучения морфологических и специфических особенностей конкретных микробов.

Одним из направлений микробиологической мысли, возникшим в результате перечисленных выше достижений, стала возможность разработки механизмов защиты против некоторых представителей патогенных микроорганизмов – серьезного агрессивного фактора окружающего мира, мешающего нормальной жизнедеятельности человека. Рассматривая продукты разработки первейших синтетических лекарственных препаратов, можно отметить некоторые известные представители такие как, сальварсан (мышьякосодержащее соединение; действует против *Treponema pallidum*), хинин (алкалоид, выделяемый из коры хинного дерева, обладает антибиотическим свойством по отношению к простейшим *Plasmodium*), меларсопрол (мышьякосодержащее соединение, действующее против *Trypanosoma brucei*). Развитие лекарственной отрасли привело к поистине колоссальному открытию – находке и идентификации антибиотиков – противобактериальных препаратов, совершенному английским ученым А. Флемингом (1881-1955) в 1924 году. Последовавшее за этим прорывом описание первых противовирусных препаратов (например, серосодержащего тиосемикарбозона - тиоацетозона; впервые описанного Г. Домагком (1895-1964) в 1946 году) позволило человечеству намного приблизиться к возможности лечения инфекционных заболеваний.

Эти лекарственные препараты помогали лечить инфекционные заболевания, но вместе с тем, не предупреждали развитие болезни, а, следовательно, параллельно разработке новых лекарств, изучались методы иммуногенного воздействия различных инфекционных агентов на организмы человека, животных. Эксперименты и последующие наблюдения позволили появиться специфическому эквиваленту широко известному в современном мире понятию «вакцинация». Этим эквивалентом послужил термин «вариоляция», основу которого составляла общая методика прививания человека, которая была создана в XVII-XVIII веках совмещением известных ранее древнекитайских и древнеиндийских практик. Общая суть вариоляции заключалась во внесении в дыхательные пути (интраназально) или через надрез на коже (парентерально) сухого порошка из пустул больного натуральной оспой (термин «вариоляция» произошел от родового названия возбудителя натуральной оспы - Variola virus.). Развитие вариоляционных практик получило в исследовании английского ученого Э. Дженнера (1749-1823), которое ознаменовало создание вакцин первого поколения – препаратов из сухого порошка пустул, снятых с вымени коров больных коровьей оспой. Сродство *Cowpox virus* и *Variola virus* позволило Дженнеру отказаться от использования в своем препарате – «вакцине (лат. *vacca* - корова)» - исключительно опасного для человека *Variola virus* (который был иммуногенным агентом в предшествующей практике – вариоляции) и заменить его на нейтральный (вызывающий исключительно зоонозы) *Cowpox virus*. Это решение позволило Дженнеру положить начало важнейшему иммуногенному мероприятию - вакцинации. Бывшие смертоносные эпидемии (II пандемия чумы 1346-1353 гг.; I эпидемия холеры 1817 г.; Средневековое массовое заболевание оспой), уносившие десятки миллионов жизней ушли в прошлое.

Появление второго поколения вакцин, введенного французским микробиологом Л. Пастером (1822-1895) в 1880-х годах, развитие методов генетики и молекулярной биологии, приведшее к появлению рекомбинантных вакцин нового поколения (2000 – н.в), позволило выйти вакцинации на совершенно новый уровень и достичь той цели, к которой стремился метод вариоляции - намного приблизиться к возможности контроля над инфекционным заболеванием и возможности его своевременного предупреждения.

Со времен Пастера активными участниками экспериментов по выяснению сущности микробов были животные. Крысы, хомяки, кролики – достаточно популярные животные объекты для исследования свойств различных микроорганизмов. Именно с помощью многочисленных пересевов культуры *Rabies lyssavirus* от кролика к кролику, Пастер в 1886 году получил вакцину против бешенства.

По разным оценкам в современном мире в исследованиях на медицинскую тематику в год используется от 50 до 100 млн позвоночных животных. Действительно, польза участия животных в медицинских исследованиях поистине велика – с их помощью происходит оценка безопасности полученных препаратов; влиянии синтезированных веществ или некоторых организмов (куда входят и микробы) на их организмы (тем самым моделируются условия, приближенные к условиям человеческого организма). Тем не менее, эксперименты над животными должны быть подкреплены основами гуманности, определены исключительно научными целями и регулируемы биоэтическими догмами. Именно биоэтическая проблема использования животных в медицинских целях задает тон политике некоторых общественных организаций (таких как PETA или BUAV), негативно настроенных ко всяческим вмешательствам в жизнедеятельность животных, а потому выступающих за запрет проведения экспериментов над животными. Именно поиск компромисса и снижение остроты биоэтических проблем, касающихся использования животных в медицинских целях, позволит исключить разногласия, найти оптимальную стратегию использования животных в медицинских целях, сделать это максимально рациональным. Именно движение за рациональное использование животных ресурсов привело нас к созданию методики неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ), которая позволяет максимально ограничить участие животных в медицинских исследованиях по определению влияния определенных культур микроорганизмов на живые организмы. Проецируя данный тезис на конкретный случай, можно отметить тестирование специальных штаммов микробов, полученных разными методиками. Метод НИВМ позволяет без использования животных сравнить коэффициент вирулентности (КВ) нескольких культур, выбрать оптимальную модель для дальнейшей культивации определенного микроба.

**Актуальность работы:**

Снижение остроты биоэтических проблем, связанных с участием животных в медицинских исследованиях.

**Цель работы:**

Создание методики неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ).

**Задачи:**

1. Изучить теоретические материалы по культурально-морфологическим свойствам микроорганизмов.
2. Изучить распространенные лабораторные методики диагностики вирулентности микроорганизмов.
3. Разработать методику неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ).
4. Продемонстрировать практическое исполнение методики и подтвердить теоретические положения методики соответствующими результатами исследований, объяснить эффективность и удобство данной методики.

**Объект исследования** – тестовые гемо-культуральные смеси (ГКС).

**Предмет исследования** – сила воздействия тестового микроорганизма на лейкоциты крови донора, способность образовывать колонии – коэффициент вирулентности (КВ) культуры.

**Глава I. Обзор литературы**

### 1. Лабораторные методы диагностики вирулентности культур микроорганизмов

Важнейшим этапом культурально-морфологического анализа служит определение возможной патогенности микроорганизма, измерение величины показателя вирулентности (описывает биологическое свойство, характеризующее степень патогенности инфекционного агента).

Основными факторами, определяющими вирулентность микроорганизма, являются следующие:

1. Фактор адгезии обуславливает способность микроорганизмов закрепляться на клетках организма с целью дальнейшего существования. Этот фактор невозможно измерить, а потому, как будет объяснено в дальнейшем, использовать его в нашей работе, в качестве источника диагностических значений невозможно.
2. Фактор колонизации демонстрирует возможность микроорганизма образовывать колонии во внутренней среде организма, увеличивать количество себе подобных, тем самым усиливая воздействие на колонизируемый организм. Данный фактор является одним из важнейших источников диагностических значений, а потому его величина будет использоваться нами в выяснении КВ культуры.
3. Фактор пенетрации характеризует способность микроорганизма проникать внутрь клеток, тем самым вызывая нарушение их нормальной жизнедеятельности и даже гибель. В период оценки результатов исследования вирулентности культуры, данный фактор можно спутать с фактором агрессии, а потому вместе они образуют одно из диагностических значений.
4. Фактор агрессии объясняет враждебное воздействие микроорганизма по отношению к клеткам организма.

Характеризуя вирулентность культуры стандартными методами, производятся исследования по определению количественных показателей, обуславливающих способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель искусственно зараженных ею животных. Изучение вирулентности микроорганизма бывает сопряжено с рядом сложностей, так как оно определяется не только культурально-морфологическими, токсигенными и биологическими свойствами микроорганизма, но и его резистентностью к живому организму, используемому в качестве подопытного существа. Данный параметр зависит от большего числа факторов, таких как вид (лабораторная линия), возраст, режим питания, температура внешней среды, способ заражения животного. Поэтому при идентификации вирулентности микроорганизма очень важно вести исследование, точно соблюдая постоянность и неизменность всех условий опыта. Чаще всего в экспериментальных условиях находятся белые мыши, однако принимая во внимание особенности резистентности микробов к определенным животным, о которых говорилось выше, в исследованиях могут принимать участие морские свинки, кролики, крысы, хомяки, хорьки, обезьяны. Также важным фактором является использование молодой (суточной) культуры микроба, так как старые содержат большое количество погибших клеток, снижая начальное значение вирулентности.

Одна из лабораторных методик определения вирулентности культуры заключается в том, что культуру микроба для заражения выращивают на плотной питательной среде, так как бульон, представляя собой сложный белковый субстрат, небезразличен для животного организма и может искажать истинные результаты эксперимента. Затем, исследуемую культуру микроба, смывают изотоническим раствором хлорида натрия с поверхности среды и стандартизуют по оптическому стандарту так, чтобы в 1 мл этого раствора содержалось определенное количество микробных клеток. Исследуемую взвесь бактерий вводят различными способами: внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, интраназально - в зависимости от целей и задач исследования.

Степень вирулентности характеризуют тремя следующими показателями:

1. Минимальная смертельная доза – «Dlm» (Dosis letalis minima), наименьшая доза микробов, которая в определенных условиях опыта вызывает гибель 95% подопытных животных.
2. Наименьшая безусловно смертельная доза – «Dll» (Dosis lerie letalis) — наименьшая доза микробов, являющаяся смертельной для 100% животных, взятых в опыт.
3. Средняя смертельная доза микробов – «LD50» (Dosis letalis 50%) - доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных.

Показатель LD50 позволяет получить более достоверные результаты, и потому он чаще других используется в практике экспериментальных исследований.

Стоит учесть, что в патологии человека большую роль также играют токсигенные микроорганизмы, например, *C. botulinum,* *C. perfringens, C. diphtheriae*, *S. aureus*, *S. pyogenus*. Экзотоксины, вырабатываемые различными представителями этой группы микробов, обладают высокой токсичностью, особой избирательностью действия с поражением отдельных структур организма (органов, тканей) и способностью при парентеральном введении в организм вызывать образование антител—антитоксинов, которые нейтрализуют соответствующие им экзотоксины. Токсигенность микробов определяют по тому же принципу, что и вирулентность, однако для постановки проб подбирают животных, наиболее чувствительных к исследуемому токсину.

### 

### 2. Теоретическая модель методики неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ). Достоинства и недостатки методики

Метод неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ) – метод лабораторной диагностики величины вирулентности микроорганизма по активности факторов колонизации и агрессии-пенетрации. Суть метода заключается в выяснении способности исследуемого микроорганизма уничтожать лейкоциты и ее величине в пересчет на 100 клеток (ЧЛЛ100), а также способности колонизировать среду обитания лейкоцитов и величине количества колоний в пересчет на 1 лейкоцит (ЧКМ1), за контрольное время равное 6 часам при температуре 37℃. При условии отсутствия патологий у донора, кровь представляет собой весьма удобную среду для диагностики вирулентности культуры. Возможность проведения данного исследования основывается на способности вирулентных штаммов отвечать на «агрессивное» (по отношению к ним) воздействие лейкоцитов крови и образовывать колонии, а авирулентных, соответственно, не отвечать на воздействие и не колонизировать среду.

Суть проведения НИВМ заключается в получении КВ культуры, очевидно характеризующий величину вирулентности данной культуры определенного микроорганизма.

Методика проведения исследования приведена далее. Свежую кровь здорового донора, декоагулированную (ДККД) консервантом (водный раствор цитрата натрия 3,5%, смешанный с кровью в соотношении объемов 1:1), помещают в 2 пробирки (для получения усредненных значений опыт проводят в 2 повторностях), куда добавляют тестовую культуру микроорганизмов в соотношении 1:1, образуя ГКС. Стоит отметить, что для выяснения микробного числа рекомендуется использовать стандартизованные культуры (по McFarland, по Koch, по Paster и т.п.). После этого следует отобрать часть ГКС для создания окрашенных мазков крови. Затем пробирки помещают в термостат при температуре 37℃ на 6 часов. По прошествии времени оценивается количество лизированных лейкоцитов на 100 подсчитанных лейкоцитов - ЧЛЛ100 - (по результатам микроскопии проб мазков крови, отобранных до и после термостатирования) по соответствующей формуле (1):

|  |  |
| --- | --- |
|  | (1) |

где *ЧЛЛ100* – число лизированных лейкоцитов на 100 подсчитанных клеток,

- число лизированных лейкоцитов на 100 клеток до термостатирования,

- число лизированных лейкоцитов на 100 клеток после термостатирования,

*100* – число лейкоцитов, принятое за 100% лейкоцитов в крови донора.

Также определяли число колоний микроорганизмов на 1 лейкоцит (ЧКМ1). Необходимо отметить, что число колоний в пробах, отобранных до термостатирования, всегда равняется «0», а потому не требует отдельного обозначения и не участвует в расчетах.

По ЧЛЛ100, ЧКМ1, а также соотношению этих показателей диагностируют КВ исследуемой культуры. Особенность записи показателя заключается в структуре данного значения и представляет собой запись вида «XX, YY», где левая половина «XX» определяет ЧКМ1, а правая часть «YY» определяет ЧЛЛ100. Данный показатель имеет особое значение в дальнейшем определении культурально-морфологических свойств микроорганизма, получении информации о влиянии на иммунную систему организма, позволяет сравнивать между собой разные штаммы одного и того же вида микроба, которые получили при проведении различных манипуляций над ним. Главным отличием метода НИВМ от метода определения степени вирулентности является его высокая информативность о влиянии конкретного штамма и вида в целом на систему инфекционной защиты организма.

К достоинствам метода НИВМ, прежде всего можно отнести собственно неинвазивный характер диагностики, что позволяет существенно снизить количество лабораторных животных, использующихся для идентификации степени вирулентности микроорганизмов (стандартными лабораторными методами) на промежуточных этапах исследований, а также сравнении вирулентности культур и штаммов. Вследствие этого отпадает необходимость частых манипуляций над животными, тем самым позволяя снизить остроту биоэтических проблем, возникающих при использовании животных в медицинских исследованиях. К тому же, применение данного метода позволяет практически исключить взаимодействие оператора с экспериментальными животными, тем самым уменьшить вероятность контаминации оператора тестовыми микроорганизмами.

К отрицательным сторонам использования метода НИВМ можно отнести некоторую неоднозначность результатов, невозможность определения степени вирулентности (численных показателей величин Dll, Dlm, LD50), использование исключительно свежей донорской крови (что во многом компенсируется использованием антикоагулянтов), достаточно высокую зависимость метода от внешних условий (соблюдение стерильности, постоянная температура инкубации 37 градусов).

## Глава II. Практическое решение методики. Анализ полученных результатов

### 1. Понятие нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ). Определение референсных значений ННРЛ. Специфика употребления показателя

Стоит отметить, что помимо гибели лейкоцитов из-за инфекционной активности микробов, существует и нормальная убыль лейкоцитов – смерть клеток от естественных причин. Для определения нормальной убыли клеток мы ввели понятие нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ), определяющее количество лизированных клеток по отношению к нормальным за 6 часов инкубации при температуре 370С. Мы учитывали это значение в определении КВ культуры.

Осуществление исследования повторяет технику методики НИВМ, однако имеет некоторые отличия (приложение 1). Свежая венозная кровь здорового человека, лишенная способности свертываться посредством обработки специфическим консервантом (3,5% водного раствора цитрата натрия), помещается в тестовые пробирки (1.1 и 1.2, соответственно), из которых отбирается материал, для создания мазков 1.1 и 1.2, чтобы выяснить показатели . После этого пробирки со смесью поместили в термостат при температуре 370С с целью обеспечения естественных условий для жизнедеятельности клеток. Через контрольное время, равное 6 часам оценили , а также в пробах из пробирок 1.1 и 1.2 (мазки 1.1 и 1.2). По величине возрастания количества лизированных (погибших) лейкоцитов в образце крови донора (ДККД) определяется значение нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ). Для вычислений мы воспользовались формулой (2):

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2) |

где *ННРЛ* – нормальная некротическая реакция лейкоцитов,

- число лизированных лейкоцитов на 100 клеток до термостатирования,

- число лизированных лейкоцитов на 100 клеток после термостатирования,

*100* – число лейкоцитов, принятое за 100% лейкоцитов в крови донора.

В нашем эксперименте значение нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ) составило 0,01 (1 клетка на 100 лейкоцитов).

Стоит отметить, что значения КВ культуры величиной 0,01 свидетельствует о влиянии ННРЛ и не может рассматриваться в качестве диагностического значения - КВ культуры.

**2. Проведение тестовых испытаний определенно вирулентной культуры (ОВК) методом НИВМ**

Исходя из описанной выше теоретической модели методики, мы приступили к ее повторению на практическом препарате (приложение 2).

Определенно вирулентной культурой (ОВК) выступила культура *Staphylococcus aureus*, выделенная нами из организма человека, контаминированного микробом.

Для проведения эксперимента мы приготовили суспензию культуры, стандартизированную по No. 2 (McFarland, 1907), смыв выросшие колонии со среды стерильным физиологическим раствором (изотонический раствор хлорида натрия 0,9%) и разбавив полученную жидкость все тем же физиологическим раствором. После этого мы добавили суспензию стафилококков в пробирки 2.1 и 2.2 объемом 0,5 мл в каждую. Затем, взяв часть получившейся ГКС для серии мазков (2.1 и 2.2 – ), поместили пробирки в термостат при температуре 370С на 6 часов. По истечении времени вновь отобрали часть ГКС для серии мазков (2.1 и 2.2 – ).

Мазки, как в случае первой, так и второй серии фиксировали 96% этиловым спиртом в течение 30 мин, затем окрашивали красителем МСФК в течение 1 минуты.

После окончательного высыхания мы проводили световую микроскопию мазков при увеличении 640х, сравнивая наличие и количество лизированных лейкоцитов на 100 лейкоцитов, определяли наличие и количество колоний микроорганизмов на 1 лейкоцит.

Показатели анализировали с помощью формулы (1) и подсчётом , определяя КВ культуры.

В нашем случае значение КВ составило 01,16 (1 колония/1лейкоцит и 16 лизированных лейкоцитов/100 подсчитанных лейкоцитов). Данная величина свидетельствует о явной вирулентности культуры, что позволяет относить *Staphylococcus aureus* к патогенным микроорганизмам.

### 3. Проведение тестовых испытаний определенно авирулентной культуры (ОАВК) методом НИВМ

Проведение тестовых испытаний определенно авирулентной культуры (ОАВК) практически не отличалось от проведения испытаний ОВК, за исключением использования другой культуры микроорганизмов (приложение 3). ОАВК в нашем случае выступила культура *Bifidobacterium bifidum*, выделенная нами из лекарственного препарата «Бифидумбактерин».

Для проведения эксперимента мы также приготовили суспензию культуры, стандартизованную по No. 2 (McFarland, 1907), разбавив препарат стерильным физиологическим раствором (изотонический раствор хлорида натрия 0,9%). После этого мы добавили суспензию бифидобактерий в пробирки 3.1 и 3.2 объемом 0,5 мл в каждую. Затем, взяв часть получившейся ГКС для серии мазков (3.1 и 3.2 – ), поместили пробирки в термостат при температуре 370С на 6 часов.

По истечении времени вновь отобрали часть ГКС для серии мазков (3.1 и 3.2 – ). Мазки красили и исследовали по той же технике, что и в предыдущем исследовании.

Показатели анализировали с помощью формулы (1) и подсчетом , определяя КВ культуры.

В нашем случае значение КВ составило 00,01 (0 колоний/1лейкоцит и 1 лизированных лейкоцитов/100 подсчитанных лейкоцитов). Данная величина демонстрирует отсутствие вирулентности у *Bifidobacterium bifidum*, так как значение вида 00,01 (как уже отмечалось выше) обусловлено влиянием показателя ННРЛ и не несет диагностического значения в составе КВ.

### 4. Анализ эффективности метода НИВМ

Изучая полученные данные, можно сделать вывод, что теоретическая модель методики НИВМ, подтвержденная практическими результатами, соответствующие гипотетическим прогнозам, является эффективной и достоверной (приложение 4).

Вместе с этим, стоит отметить, что после проведения теоретической части исследования мы получили рабочую схему выполнения методики (приложение 5).

Простая механика метода НИВМ, основанная на естественных процессах – процессах иммунного ответа и антагонистической роли микроорганизмов, позволяющей им выживать и продолжать жить внутри организма, блокируя атаки иммунных клеток – позволяет использовать данный метод со всеми известными микроорганизмами, исключает поиск специфически чувствительных животных. Методика позволяет совсем отказаться от использования животных, соответствуя биоэтическим и экологическим критериям гуманистических настроений современной медицинской диагностики.

## 

## Заключение

В процессе работы над проектом мы изучили основные культурально-морфологические показатели исследуемых микроорганизмов, познакомились с методиками определения вирулентности культур, изучили проблемы биоэтического и экологического характера в ключе использования животных в медицинских исследованиях.

Распространенные методы диагностики (идентификации) вирулентности культур микроорганизмов включают в себя обязательное использование достаточно большого количества подопытных животных для определения диагностических значений степени вирулентности: Dlm, Dll и LD50. Безусловно, использование животных в медицинских целях играет важную роль в испытании созданных препаратов – проверке на безопасность, отсутствие серьезных побочных действий на организм, эффективность препарата. Однако злоупотребление животными ресурсами создает перечень биоэтических проблем, которые вызывают тревогу и негативную реакцию со стороны общественности. Как отмечалось во введении, для исключения конфликтов, необходим поиск компромисса и методов рационального использования биоресурсов. Соответственно, метод НИВМ является одним из альтернативных способов научного исследования, соответствующего критериям биоэтики, гуманистических идеалов и экологической повестке современности.

Итогом нашей работы стала уникальная рабочая методика неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ), эффективность которой была доказана серией экспериментов.

Методика НИВМ позволяет оценивать степень вирулентности микроорганизма, не используя животные организмы (непосредственно не влияя на их жизнь и здоровье). Данный метод подойдет для определения вирулентности микроорганизма в спектре сравнения нескольких культур, полученных различными способами (на различных платформах). Разработанная нами методика НИВМ проста и удобна в использовании на практике, не требует крупных материальных затрат и наличия сложного дорогостоящего оборудования.

## Информационные источники

1. Камышева, К.С. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований [Текст] / К.С. Камышева. – Ростов н/Д: Феникс, 2016. – 346 с.
2. Медуницын, Н.В. Вакцинология [Текст] / Н.В. Медуницын. – Москва: Триада, 2010. – 512 с.
3. Определение вирулентности микробов [Электронный ресурс]: энциклопедическая статья – режим доступа к журн.: https://infopedia.su/4x31a2.html
4. Лейкоциты [Электронный ресурс]: энциклопедическая статья – режим доступа к журн.: https://ru.wikipedia.org/wiki/Лейкоциты
5. Jenner, Edward. An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolæ Vaccinæ, Or Cow-Pox, 1798 // The Three Original Publications on Vaccination Against Smallpox : [англ.]. — New York : P. F. Collier & Son, 1909−14. — Vol. 38. Part 4 of 8. — (The Harvard Classics).

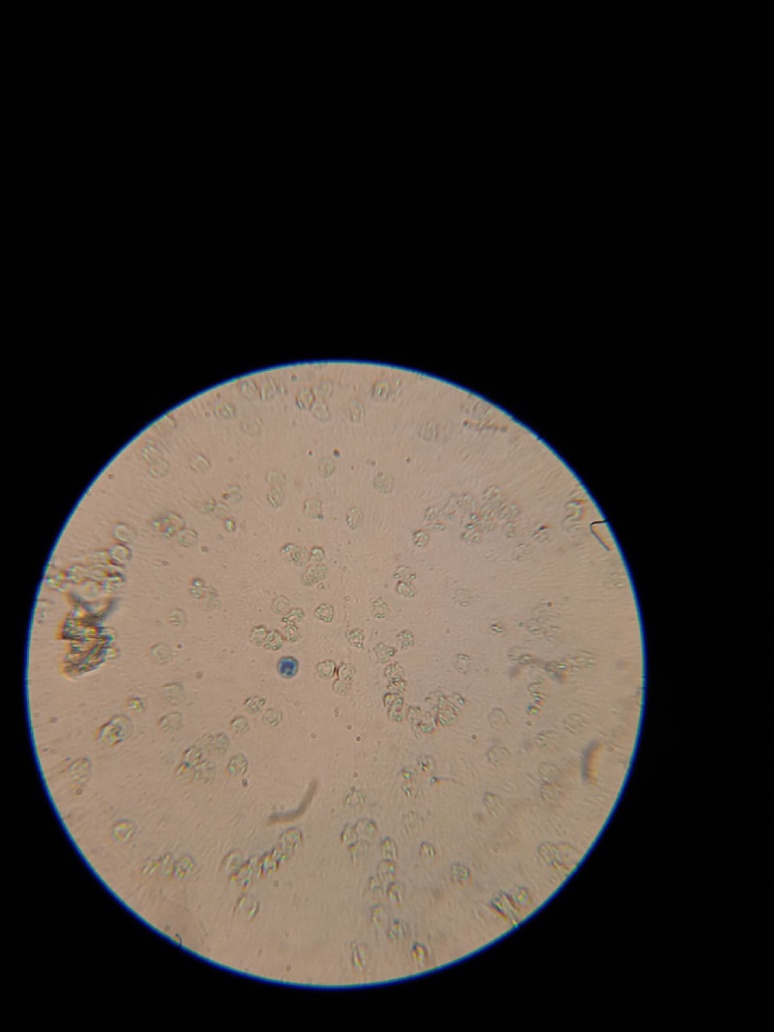
*Приложение 1*

Определение референсных значений нормальной некротической реакции лейкоцитов (ННРЛ).



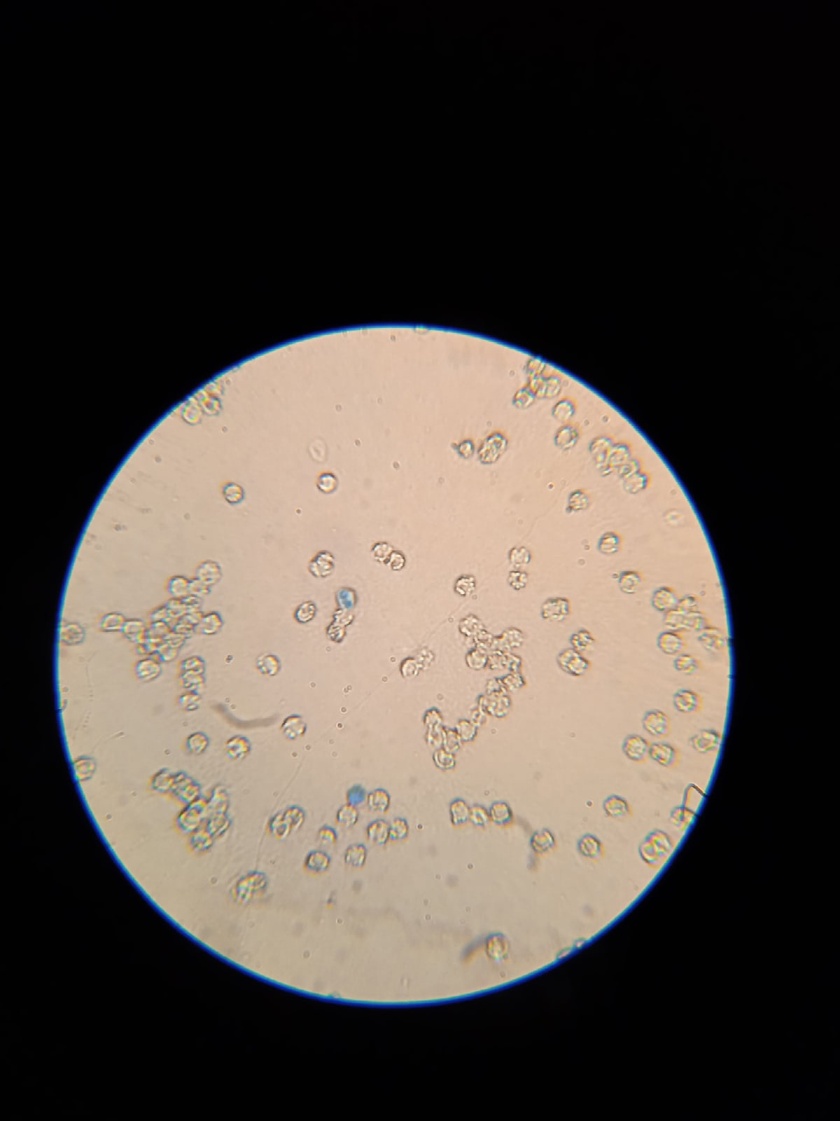
Смесь крови донора и антикоагулянта (цитрата натрия) в соотношении 1:1

**До термостатирования**



Мазок №1

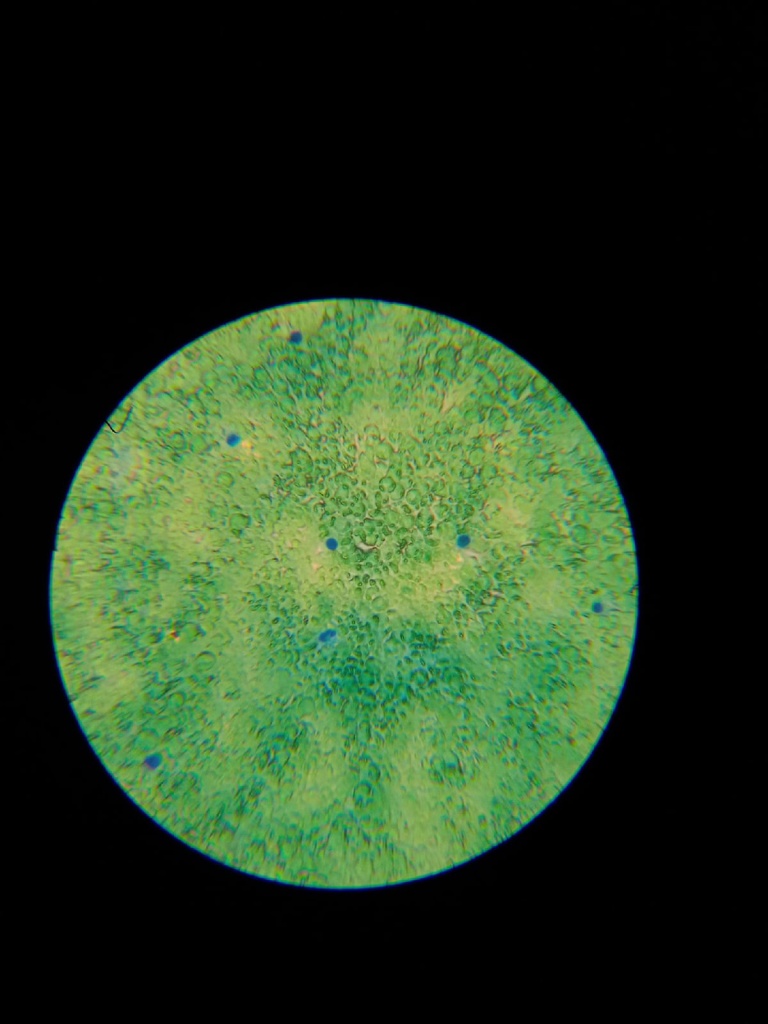
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

**

Мазок №2

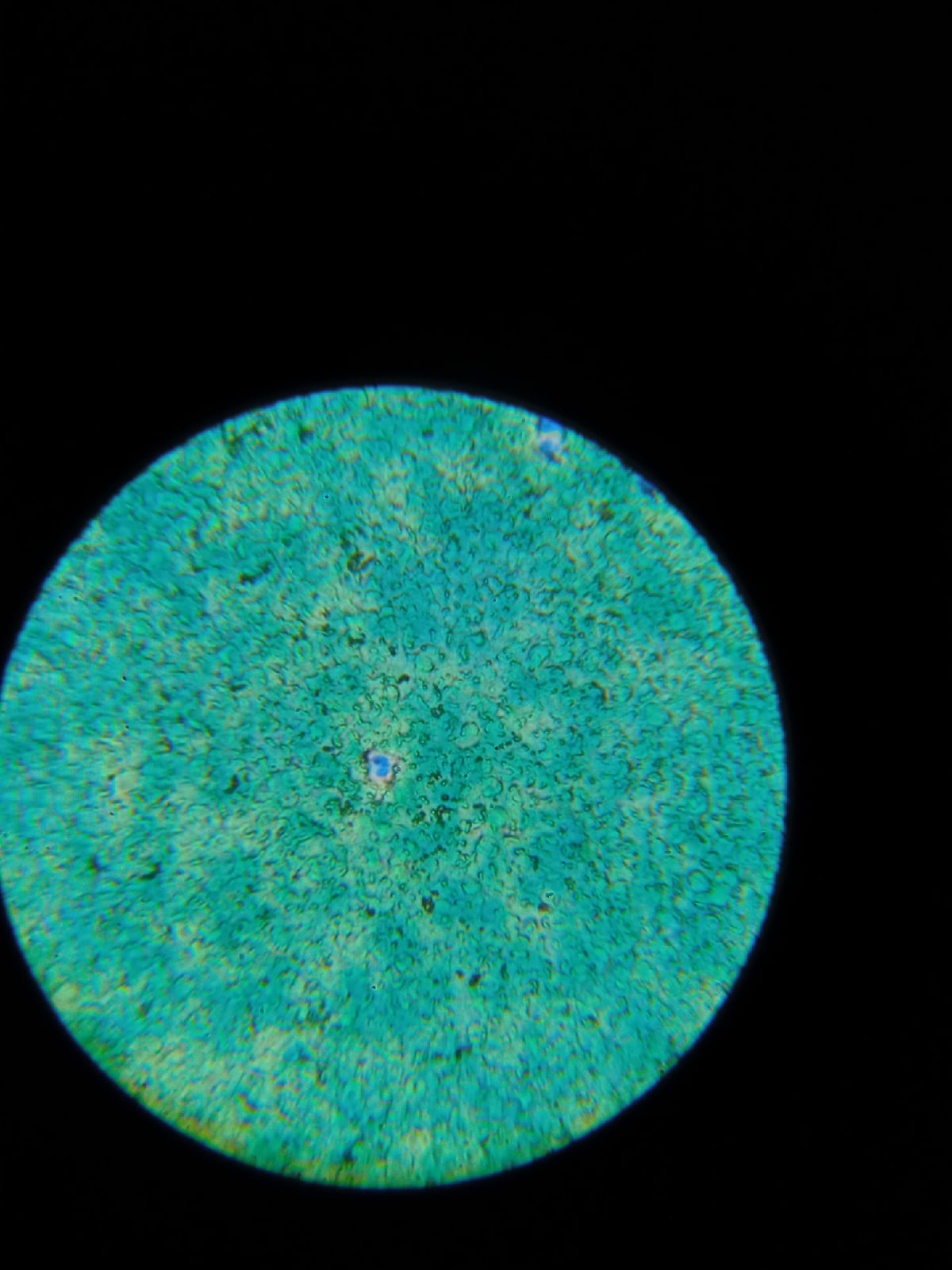
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

**После термостатирования**

**

Мазок №1

*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*



Мазок №2

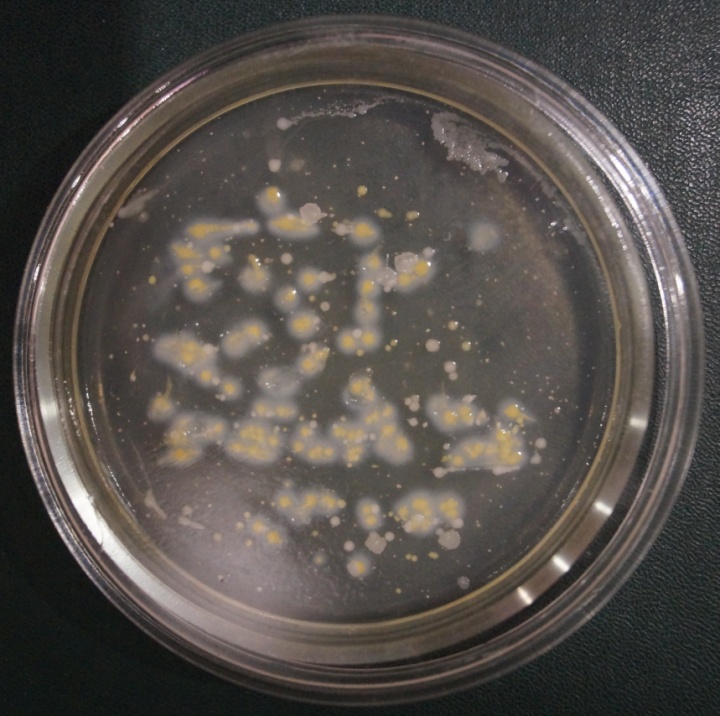
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

*Приложение 2*

Проведение тестовых испытаний определенно вирулентной культуры (ОВК) методом неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизмов (НИВМ).

Источник ОВК

*Желточно-солевой агар*





Золотистый стафилококк

*(Staphylococcus aureus)*

*Оптическая микроскопия, 1600х*

*Окраска по Граму*

Определенно вирулентная культура

(ОВК)

*Водная суспензия*

*No. 2 (McFarland Standard, 1907)*



Пробирка №2.1

*ГКС*

Смесь декоагулированной крови донора и культуры микроорганизмов

в соотношении 1:1/2



Пробирка №2.2

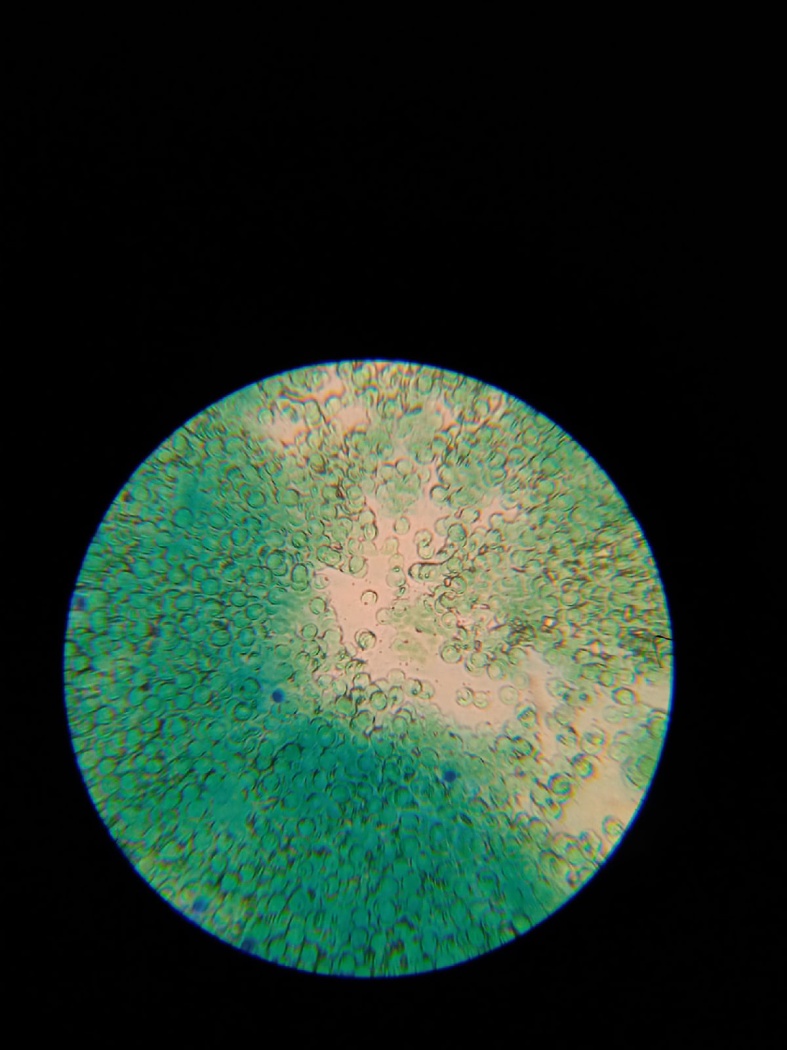
*ГКС*

Смесь декоагулированной крови донора и культуры микроорганизмов

в соотношении 1:1/2

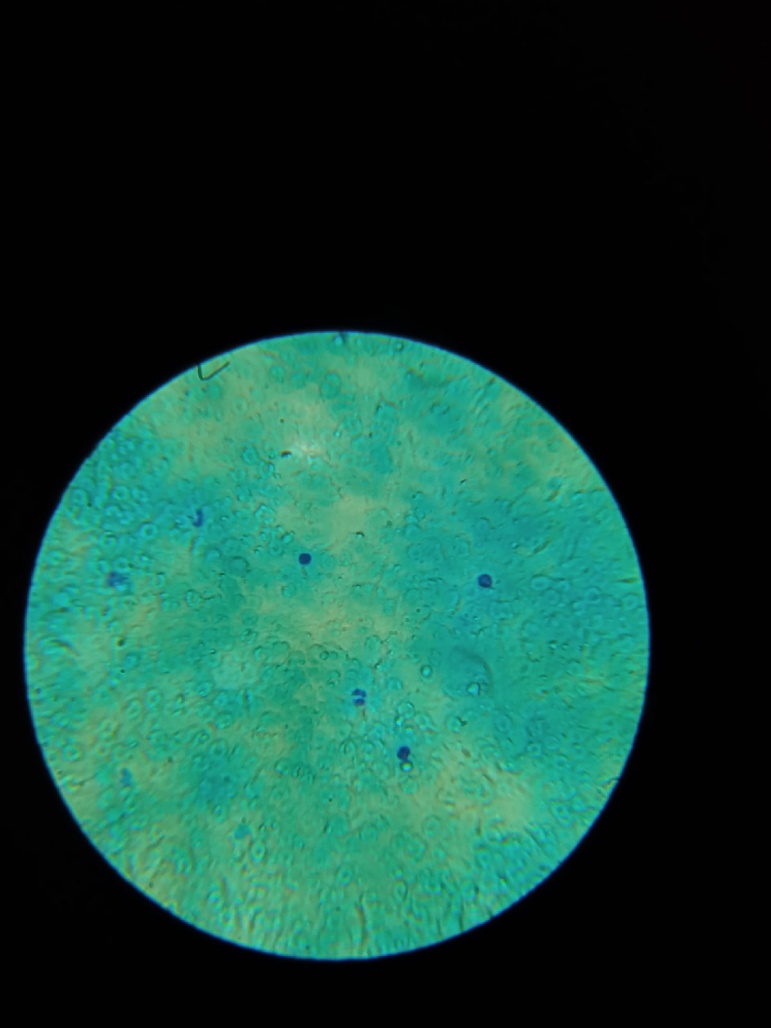


**До термостатирования**



Мазок №1

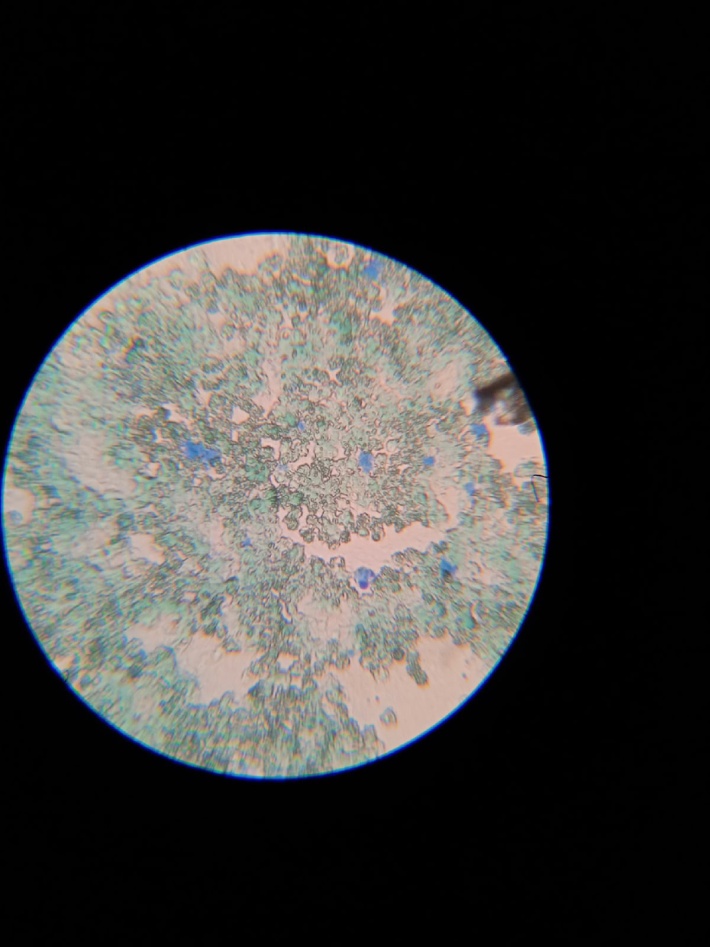
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*



Мазок №2

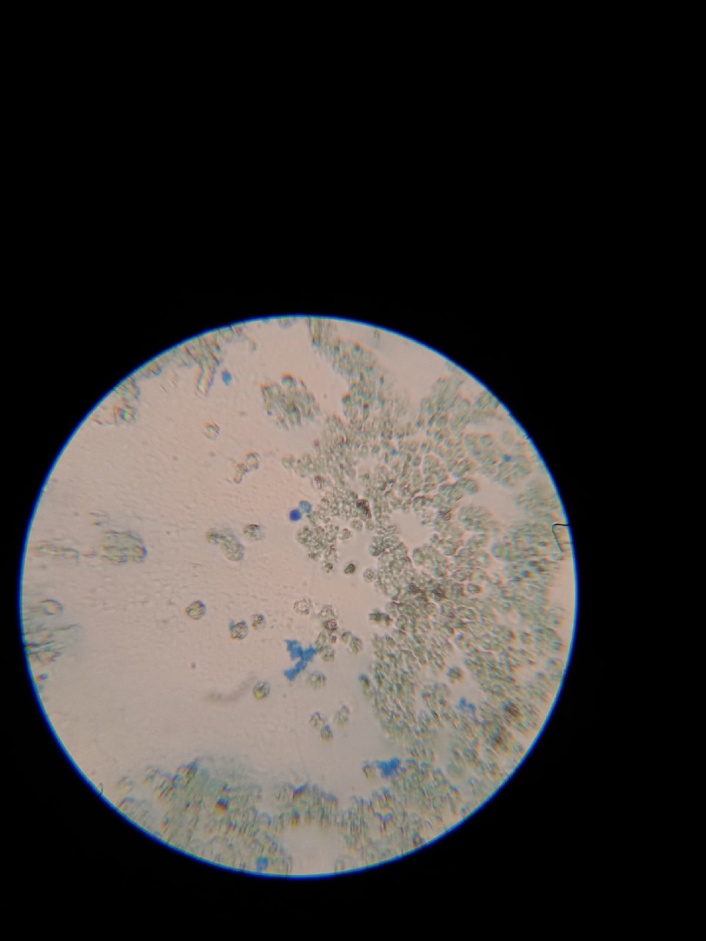
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

**После термостатирования**



Мазок №1

*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*



Мазок №2

*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

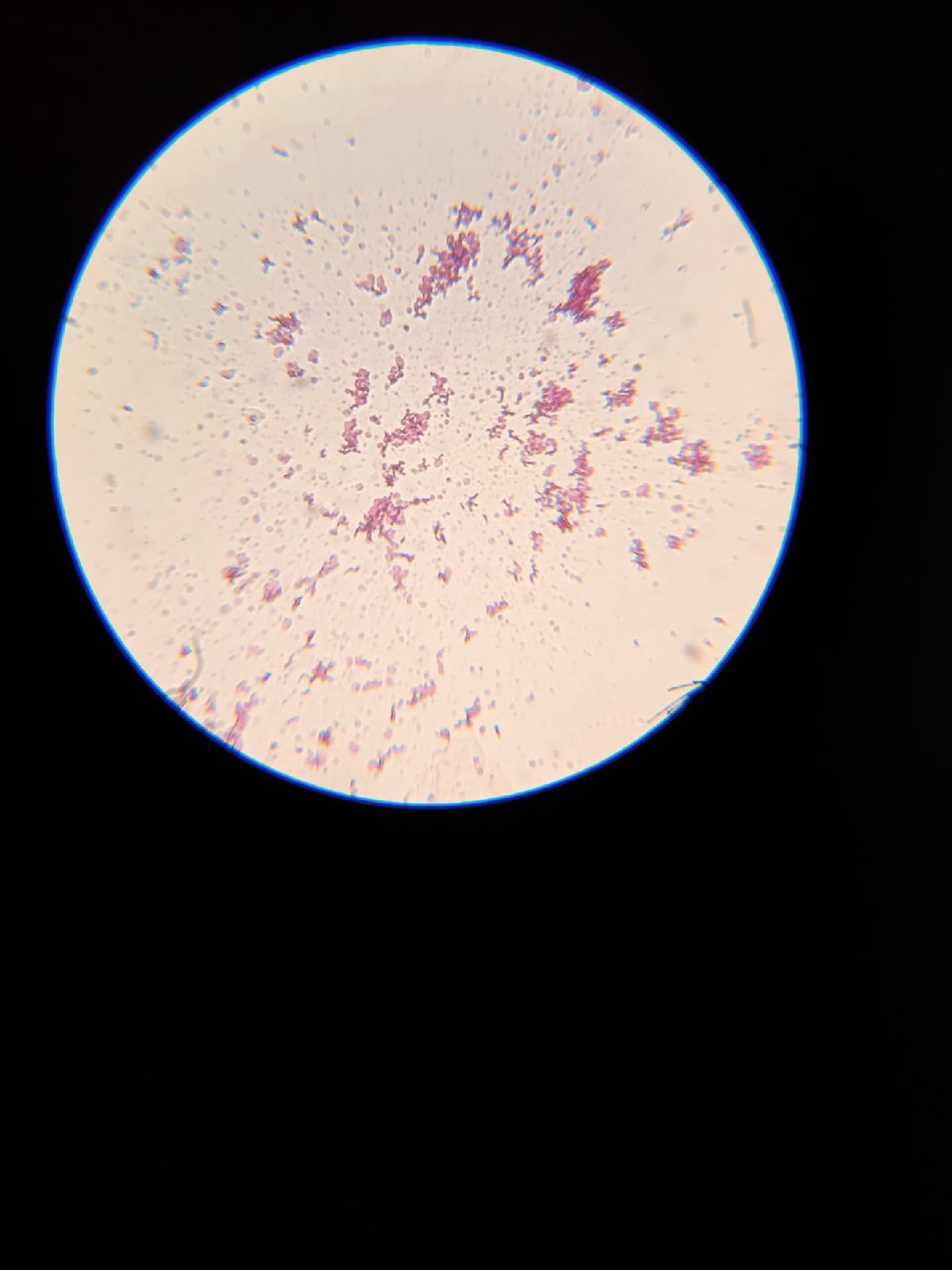
*Приложение 3*

Проведение тестовых испытаний определенно авирулентной культуры (ОАВК) методом неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизмов (НИВМ).



Источник ОАВК

*«Бифидумбактерин»*



Бифидобактерии бифидум

(*Bifidobacterium bifidum*)

*Оптическая микроскопия, 1600х*

*Окраска по Граму*



Определенно авирулентная культура

(ОАВК)

*Водная суспензия*

*No. 2 (McFarland Standard, 1907)*

Смесь декоагулированной крови донора и культуры микроорганизмов

в соотношении 1:1/2

Пробирка №3.1

*ГКС*

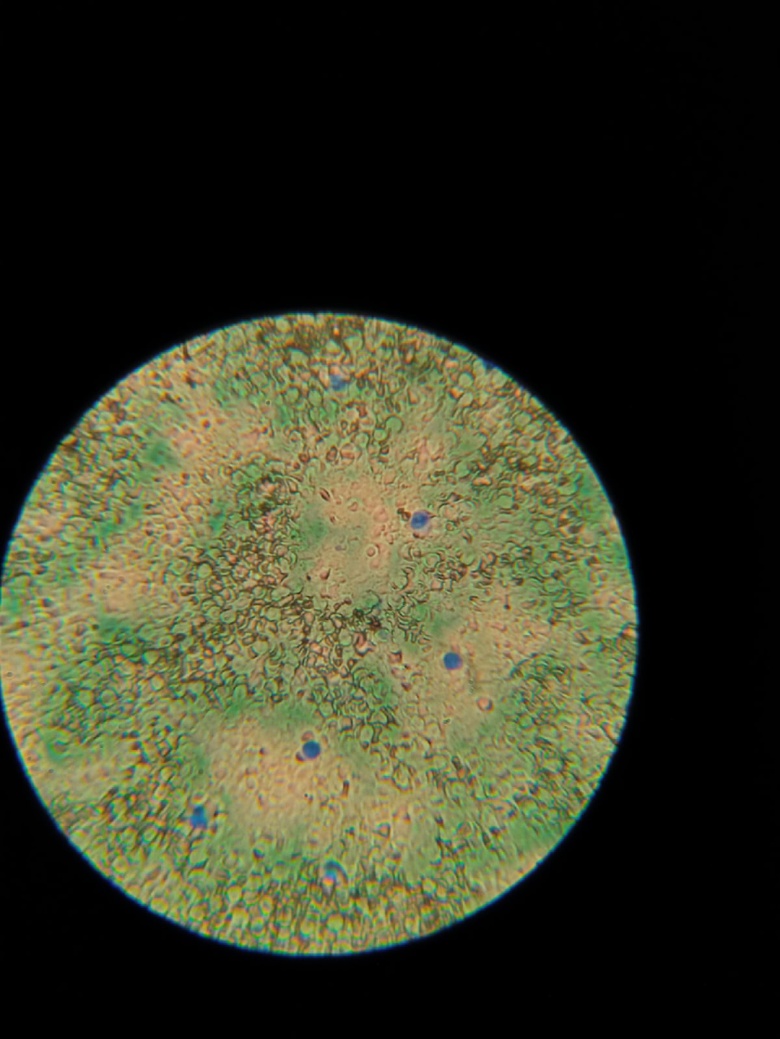


Пробирка №3.2

*ГКС*

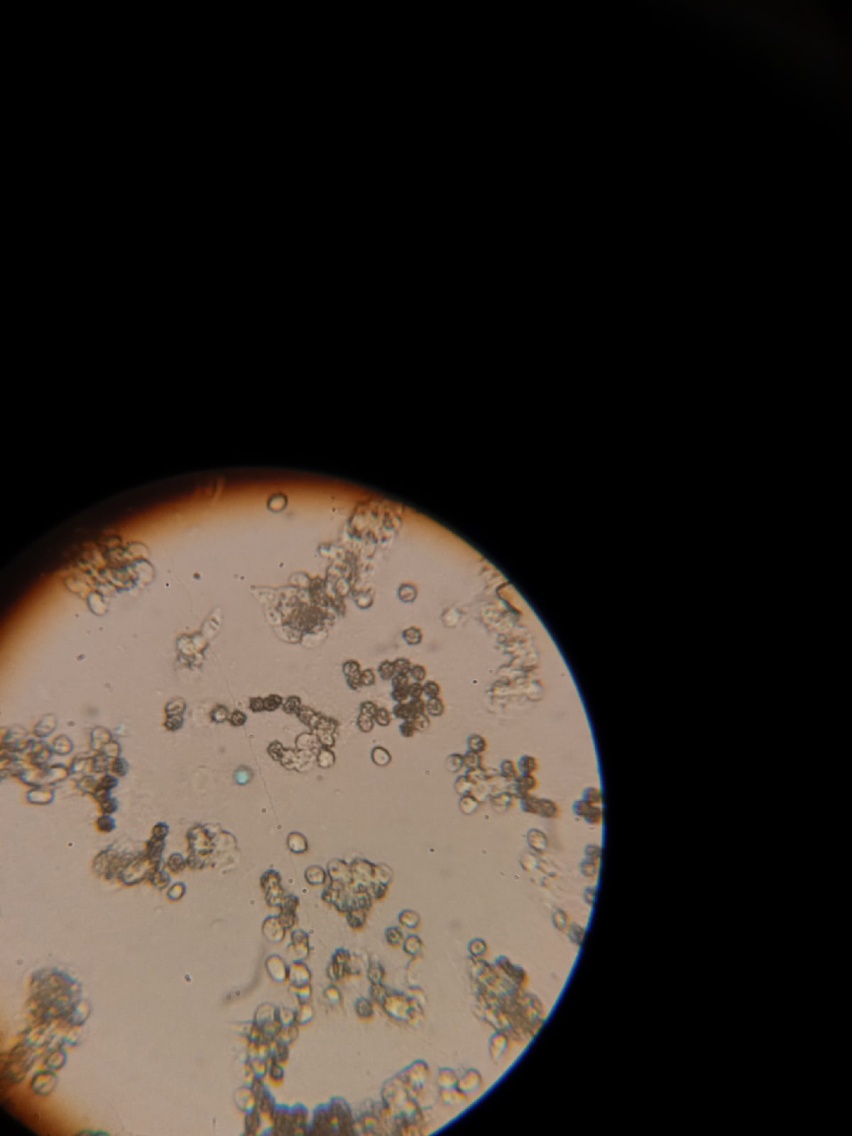


**До термостатирования**



Мазок №1

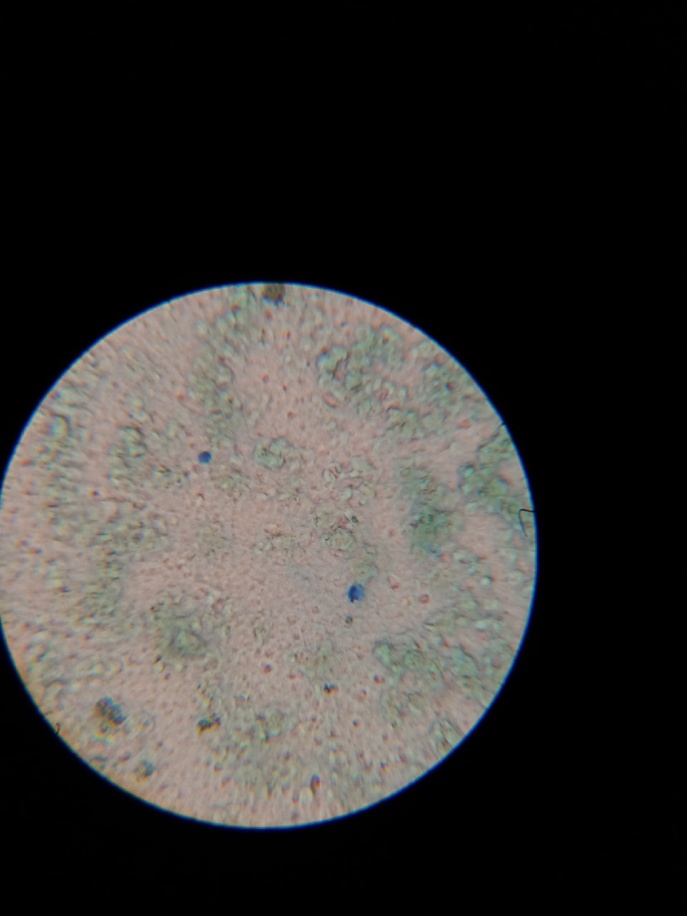
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*



Мазок №2

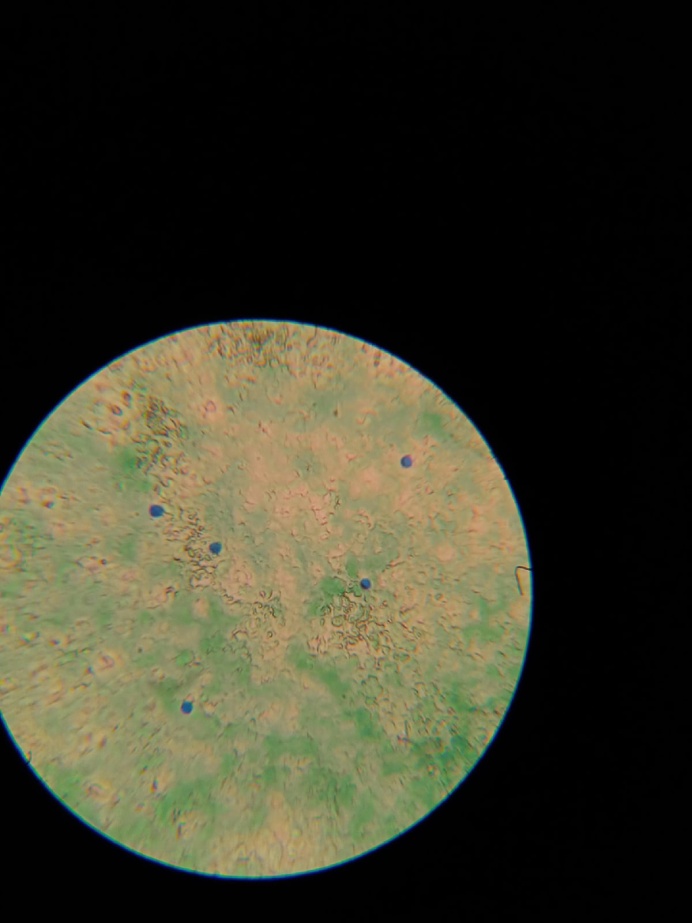
*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

**После термостатирования**



Мазок №1

*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*



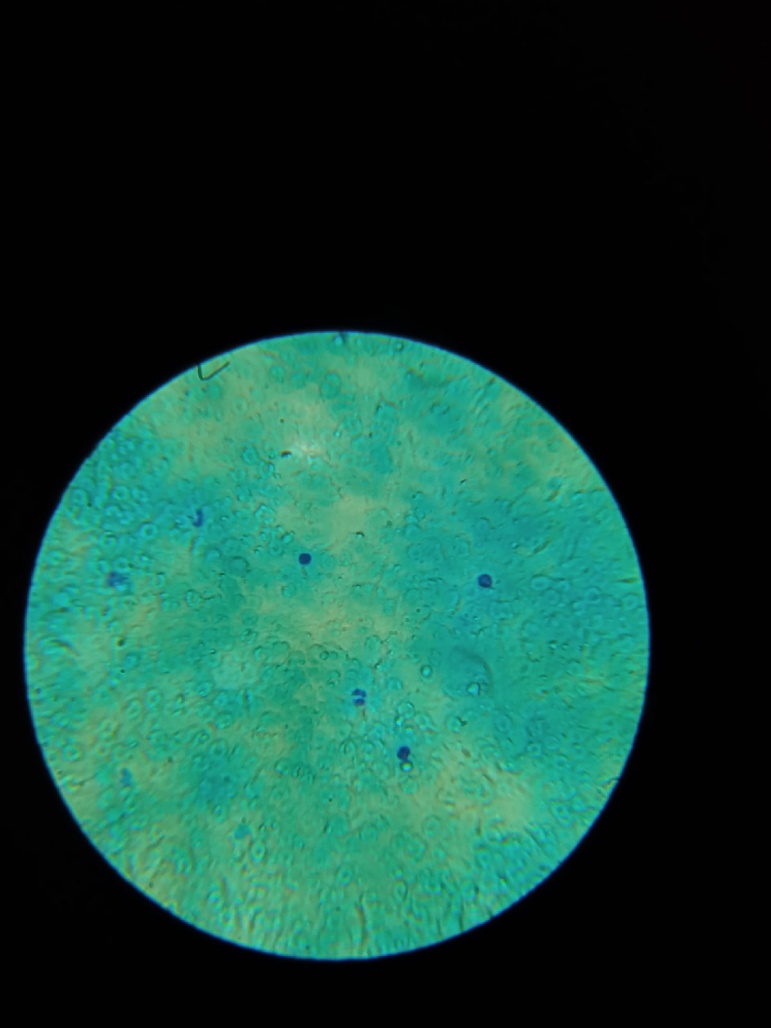
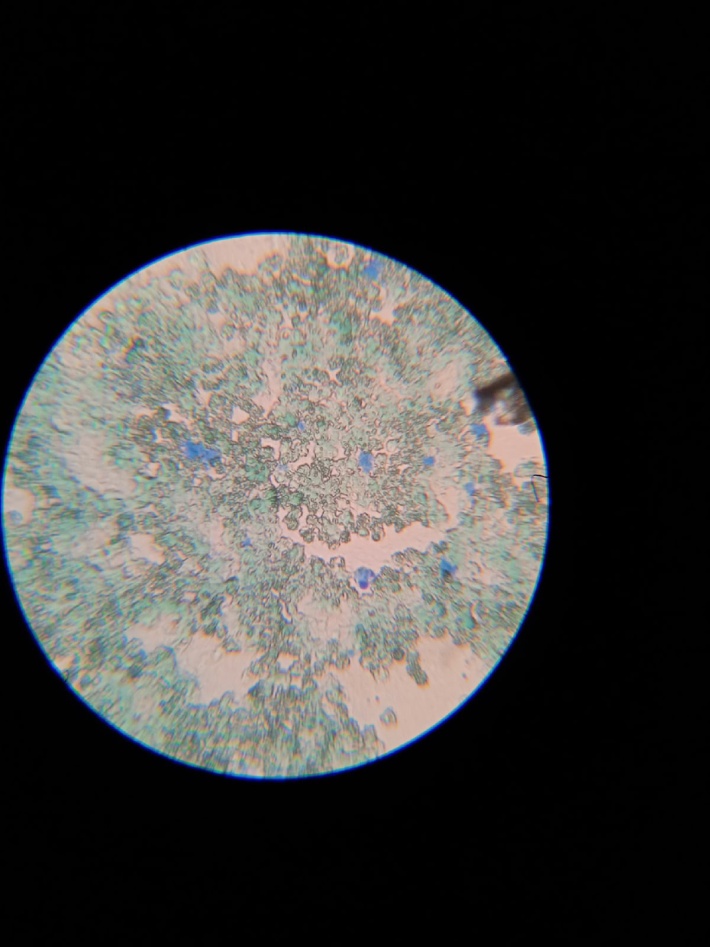
Мазок №2

*Оптическая микроскопия, 640х, МСФК*

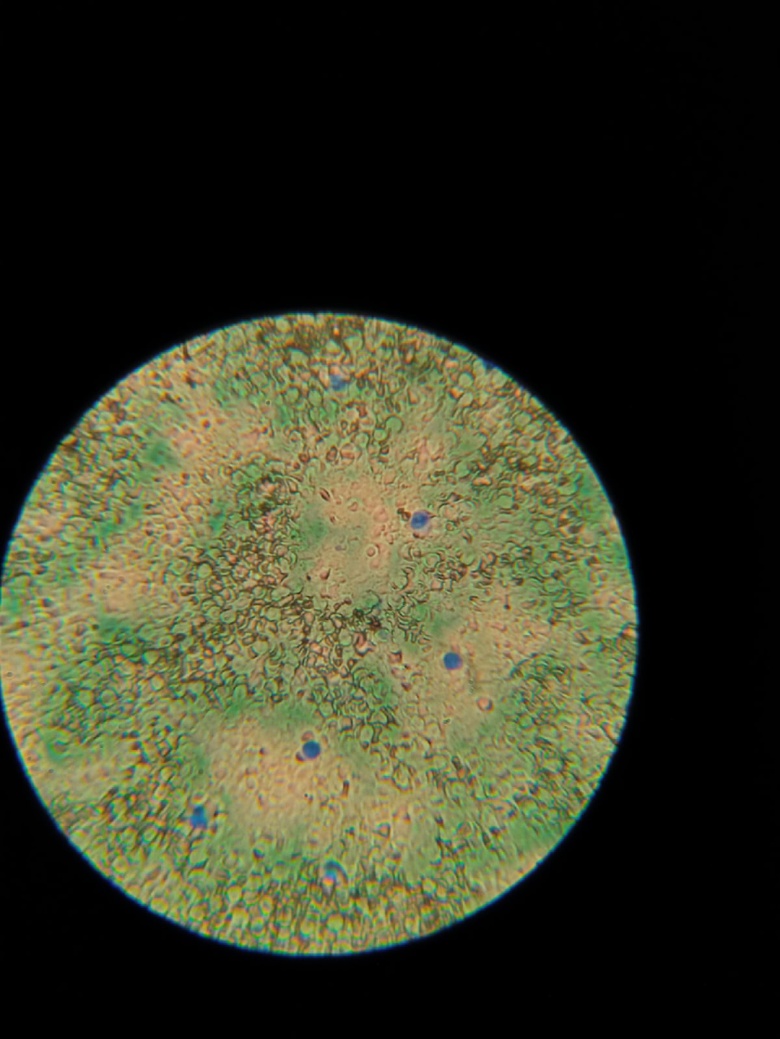
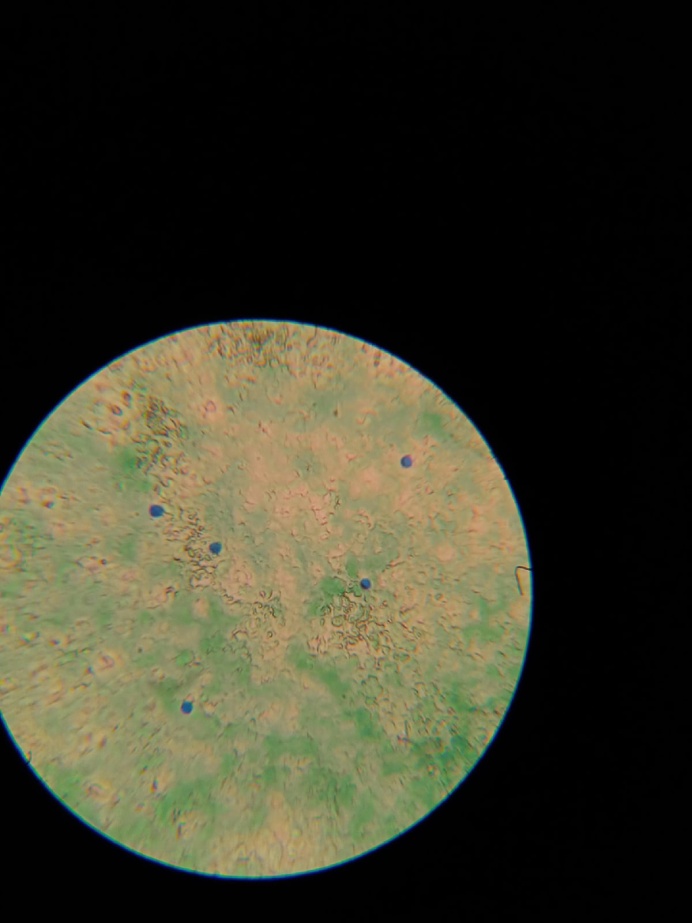
*Приложение 4*

Анализ эффективности метода неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизмов (НИВМ)

ОВК

ОАВК

# *Приложение 5*

**Порядок проведения оценки вирулентности микроорганизма методикой неинвазивной идентификации вирулентности микроорганизма (НИВМ)**

1. Свежую декоагулированную кровь здорового донора помещают в 2 пробирки;
2. Добавляют тестовую культуру микроорганизмов в соотношении 1:1, образуя гемо-культуральную смесь (ГКС);
3. Отбирают часть ГКС для создания мазков крови, делают окрашенные мазки;
4. Пробирки с ГКС помещают в термостат при температуре 370С на 6 часов, по прошествии времени вынимают пробирки из термостата;
5. Отбирают часть ГКС для создания мазков крови, делают окрашенные мазки;
6. Проводят световую микроскопию мазков, оценивают количество лизированных лейкоцитов на 100 подсчитанных клеток (ЧЛЛ100) и число колоний в пересчет на 1 лейкоцит () из проб отобранных до () и после ( и ) термостатирования;
7. Выводят коэффициент вирулентности (КВ) культуры.